

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Síntesis, caracterización y biotransformación de nanopartículas de selenio: aplicación al desarrollo de envases antioxidantes

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Palomo Sigüero

Directora
Yolanda Madrid Albarrán

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y BIOTRANSFORMACIÓN
DE NANOPARTÍCULAS DE SELENIO.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE ENVASES ANTIOXIDANTES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Palomo Siguero

**Directora
Yolanda Madrid Albarrán**

Madrid, 2015

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y BIOTRANSFORMACIÓN
DE NANOPARTÍCULAS DE SELENIO.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE ENVASES ANTIOXIDANTES**

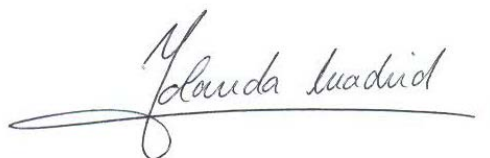
**Directora:
Dra. Yolanda Madrid Albarrán**

**María Palomo Siguero
Madrid, 2015**

Da. YOLANDA MADRID ALBARRÁN, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,
HACE CONSTAR QUE:

El presente trabajo, titulado **“Síntesis, caracterización y biotransformación de nanopartículas de selenio. Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes”** ha sido realizado en este Departamento, bajo mi supervisión, por la Licenciada Da. María Palomo Siguero, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 4 de Junio de 2015

A handwritten signature in dark ink, reading 'Yolanda Madrid Albarrán', with a long horizontal flourish extending to the left.

Fdo.: Yolanda Madrid Albarrán

Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.
Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes

ÍNDICE

ÍNDICE

I. SUMMARY.....	11
II. INTRODUCCIÓN.....	19
Selenio y Nanopartículas de Selenio.....	19
I. Selenio: Elemento Esencial para los Seres Vivos.....	20
I.1. Esencialidad del selenio: selenoproteínas.....	21
I.2. Relevancia Biológica del Selenio. Efecto antioxidante y anticarcinogénico. Estados carenciales de selenio.....	25
I.2.1. Efecto de la deficiencia.....	30
I.2.2. Efecto de los elevados niveles de selenio: Selenosis.....	32
I.3. El selenio en los alimentos.....	34
I.3.1. Fuentes de selenio en la dieta.....	34
I.3.2. Aumento del estatus de selenio: Desarrollo de alimentos funcionales y biofortificación de cultivos	37
II. Nanopartículas de Selenio.....	42
II.1. Reactividad de las nanopartículas de selenio: métodos de síntesis y estabilización de dispersiones.....	43
II.2. Efectos biológicos de las nanopartículas de selenio.....	46
I.2.1. Capacidad antioxidante y citotoxicidad.....	46
I.2.2. Ecotoxicidad y fitotoxicidad.....	48
II.3. Aplicaciones de las nanopartículas de selenio.....	49
Metodologías Analíticas y (Bio)Analíticas	52
I. Metodologías Analíticas para la determinación de selenio y sus especies en muestras biológicas.....	52
I.1. Tratamiento de la muestra.....	53
I.1.1. Determinación del contenido total de selenio.....	54

I.1.2. Extracción de especies de selenio.....	54
I.2. Separación e identificación de especies de selenio.....	56
I.2.1. Técnicas hífenadas: métodos cromatográficos con acoplamiento a la espectrometría de masas.....	59
I.2.2. Técnicas de espectrometría de masas para la identificación de especies de selenio.....	59
I.2.3. Problemática y validación de los resultados en la especiación de selenio.....	60
II. Metodologías Analíticas para el análisis de nanopartículas de selenio.....	62
II.1. Análisis Cualitativo: caracterización y detección de nanopartículas.....	64
II.1.1. Técnicas de microscopía electrónica.....	65
II.1.2. Técnicas basadas en la dispersión de luz.....	67
II.2. Análisis Cuantitativo.....	69
II.2.1. Métodos de separación.....	69
II.2.2. Técnicas de separación basadas en la cromatografía y fraccionamiento de flujo	71
II.2.3. La técnica del ICPMS en el campo del análisis de nanopartículas metálicas	75
III. Metodologías (Bio)Analíticas para la evaluación de los efectos biológicos asociados a la exposición a selenio y nanopartículas de selenio.....	80
III.1. Determinación de la viabilidad celular.....	81
III.1.1. Integridad de la membrana celular.....	81
III.1.2. Actividad metabólica.....	83
III.1.3. Evaluación del estrés oxidativo.....	84
III.1.4. Medida del grado de apoptosis.....	85
III.2. Internalización y Localización Intracelular.....	87
III.2.1. Técnicas microscópicas.....	87
IV. Metodologías para la evaluación de la capacidad antioxidante.....	90

Referencias Bibliográficas.....	95
III. OBJETIVOS.....	119
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	121
Capítulo I. Síntesis y caracterización de nanopartículas de selenio.....	122
I.1. Efecto de los agente estabilizante en el tamaño y morfología de SeNPs: Caracterización analítica mediante fraccionamiento de flujo con campo de flujo asimétrico (AF ⁴) acoplado a ICPMS y microscopía de transmisión electrónica.....	125
Capítulo II. Biotransformación y toxicidad de SeNPs en bacterias lácticas y plantas..	147
II.1. Transformación del Selenio durante la fermentación láctica de yogurt enriquecido en selenio.....	153
II.2. Acumulación, biotransformación y toxicidad de SeNPs en bacterias lácticas.....	173
II.2.1. Acumulación, biotransformación y toxicidad de SeNPs en <i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	175
II.2.2. Dependencia del agente estabilizante en la toxicidad de SeNPs en <i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	201
II.3. Acumulación y biotransformación de nanopartículas de selenio estabilizadas con chitosan en rábanos expuestos (<i>Raphanus Sativus</i>).....	231
Capítulo III. Desarrollo de nuevos envases alimentarios e incorporación de nanopartículas de selenio con capacidad antioxidante.....	255
II.1. Evaluación de la capacidad antioxidante de diferentes materiales con nanopartículas de selenio como material activo.....	258
II.2. Migración de nanopartículas de selenio en envases alimentarios mediante el empleo de simulantes alimentarios y alimentos	279
V. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....	282
VI. CONCLUSIONES.....	305
VII. TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS.....	308
VII.1. Selenoproteínas: factor clave de la esencialidad del selenio. Técnicas Analíticas Avanzadas para el estudio de Selenoproteínas.....	312
VII.2. Suplementación de Selenio por Adición de Seleniato Sódico a los	324

	aditivos de ensilaje.....	
VIII.	GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	333

Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.
Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes

I. SUMMARY

SUMMARY

I.1. INTRODUCTION

Selenium (Se) is an essential element for human health. The health-promoting properties of Se are due to vital functions of selenoproteins in which selenium is present as selenocysteine (SeCys). The important role of selenoproteins in human metabolism justifies the adverse consequence of selenium deficiency. There are several parts of the world where selenium content in the diet has been estimated insufficient to reach correct activity of selenoproteins. For all commented above, the production of Se-enriched food and nutritional supplements is getting interest in the last years. Two main approaches have been applied for developing Se-enriched food and feed: 1) Development of Selenium-enriched fermented product (based on the capability of Lactic bacteria to incorporate and biotransform inorganic selenium into organic Se-compounds which are considered nutritional safer and more bioactive than inorganic Se) and 2) Development of Se-enriched vegetables (based on the capability of some plants to biotransform inorganic selenium into seleno aminoacids). In most of the studies appeared in the literature selenium is supplemented as inorganic selenium.

Nanotechnology has been touted as the next revolution in many industries, including food processing and packaging. The applications of nano-based technology in food industry may include nano scale vehicles for delivering nutrients and sensitive bioactives, nanoscale films for food packaging and contact materials, nanoscale systems for controlled releasing of fertilizer and pesticides, safety and biosecurity (e.g. nanosensors), and nanotoxicity. Based on these advances, nanotechnology could be also applied for developing selenium nanoparticles as a vehicle for delivering selenium in living systems and for marketing food packaging with antioxidant properties.

Selenium nanoparticles (SeNPs), which can be considered a novel Se compound, has shown to have excellent antioxidants properties and low toxicity when comparing with other Se-species such as SeMet and MeSeCys. Most of the studies concerning selenium nanoparticles are mainly focused on the interaction of SeNPs with biological systems, being their potential in food and agriculture less explored.

Characterization of size, morphology and effects of SeNPs on living system is not an easy task requiring the combination of different analytical technologies. Transmission electron microscopy (TEM) and Asymmetrical flow field flow fractionation (AF⁴) on line coupled to ICPMS are used to observe the distribution of SeNPs in the living system and to characterize the synthesized SeNPs. Selenium transformation can be evaluated by using high performance liquid chromatography (HPLC) on line coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and the viability of cells, or bacteria in presence of SeNPs can be assessed by flow cytometry using the live/dead test.

I.2. OBJECTIVES

The main goals of this thesis are focused on **the synthesis and characterization of SeNPs and their potential application to the food technology field by developing the following applications:**

- 1) Development of Se-enriched food products (based on lactic fermentation process and the use of vegetables). For this purpose, the accumulation, biotransformation and toxicity of SeNPs in Lactic bacteria (*Lactobacillus bulgaricus*) and radish plants (*Raphanus sativus*) will be assessed.
- 2) Development of a new food packaging with antioxidant properties by incorporation of nanoparticles of selenium

These objectives will be accomplished by performing the following tasks:

- **Synthesis and characterization of SeNPs.** SeNPs will be synthesized by using different capping agents (polimers and non- ionic surfactants) allowed by food regulation. SeNPs characterization in terms of size and morphology will be achieved by applying transmission electron microscopy (TEM) and asymmetrical flow field flow fractionation (AF⁴) on line coupled to ICPMS.
- **Acumulation, biotransformation and toxicity of SeNPs on lactic bacteria and plants.** This study will imply the development of an analytical methodology which combines a great variety of analytical techniques: inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICPMS) and HPLC-ICPMS for determining total selenium and selenium species, respectively; flow cytometry using the live/dead test for assessing bacteria viability in presence of SeNPs and TEM for SeNPs localization. The results obtained will be compared with those provided when supplementing selenium as selenite.
- **Development of a new food packaging with antioxidant properties by incorporation of SeNPs.** For this purpose, the antioxidant activity of the different SeNPs suspensions and the final material will be measured by employing different methodologies. Moreover, the migration of SeNPs from packaging to the food will be assessed, either by using easy oxidable food such as hazelnuts.

I.3. RESULTS AND DISCUSION

The main goals of this thesis are focused on the synthesis and characterization of SeNPs and their potential application to the food technology field: developing of Se-enriched food and a food packaging with antioxidant properties. A brief discussion of the results obtained is given below.

I.3.1. Synthesis and characterization of SeNPs

“Effect of capping agents on size and morphology on selenium nanoparticles: Analytical characterisation by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Sspectrometry and Transmission Electron Microscopy”

Selenium nanoparticles obtained using different stabilizing agents such as polysaccharides Chitosan (Poly(D-glucosamine)) and Hydroxyethyl cellulose (HEC), and non-ionic surfactants (Triton X-100 (*t*-octylphenoxy polyethoxy ethanol), and 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate) were stable and spherical within a range size of (20-40), (\approx 100), (18-40) and (28-60) nm, respectively. The use of isotridecanol ethoxylate as stabilizer agent produced nanorods morphology. The formation of Se NPs with nano-metric sizes can be controlled by varying key processing conditions, such as the concentration and the chemical composition of the stabilizing agent, the ascorbic acid/ Na_2SeO_3 precursor ratio, and the pH. We showed that Se NPs larger in size are achieved by increasing the concentration of the stabilizer. The use of non-ionic surfactants in the synthesis of Se NPs provided stable and spherical nanoparticles in almost all cases. The behavior of these NPs was similar to those obtained with Chitosan, except for the differences due to flocculation and aggregation processes with pH modifications.

Their size and aggregation were characterized by Transmission Electronic Microscopy (TEM) and by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF^4) coupled to DAD-UV and ICPMS detectors. In this study asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS has been shown as an appropriate technique to separate, detect, and quantify selenium nanoparticles.

I.3.2. Biotransformation and toxicity of SeNPs on lactic bacteria and plants

“Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt”

The use of AF^4 combined with SDS-PAGE allow us to detect four Se-containing bands in the soluble protein fraction of Se-enriched and control yogurt, with a molecular weight ranging between 10 and 70 kDa. Protein identification by post-tryptic digestion of the Se-containing bands and nano-HPLC ESI/LTQMS, revealed the presence of Met- and Cys- containing proteins and, two proteins involved in anti-oxidant functions such as thioredoxin and glutaredoxin. In the presence of Se, no chaperones were detected, which might indicate that selenium could play a role in chaperone expression and therefore in decreasing the stress factor affecting the *Lactobacillus*. The low amounts

of Se made it difficult to determine any other specific Se-peptides in the proteins identified in the Se-containing fractions.

“Understanding the accumulation, biotransformation and toxicity of selenium nanoparticles in Lactobacillus Bulgaricus” and “Evaluation of coating material dependent on toxicity of SeNPs to L. Bulgaricus”.

This study, for the first time, shows that *L. Bulgaricus* are able to accumulate and biotransform selenium nanoparticles. A low transformation into organic forms (selenoamino acids) was observed when bacteria were exposed to selenite. Meanwhile in bacteria grown in SeNPs-enriched media practically all the selenium content was identified as seleno aminoacids at low concentrations of Se ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The fact that *Lactobacillus* was more efficient in transforming SeNPs than selenite could also explain the differences observed in viability. Results from live/dead assays implied that SeNPs killed approximately 20% of *Lactobacillus* after 24 hours while the percentage increase up to 60% of bacteria when selenite was applied. TEM measurements show that chitosan modified SeNPs (CS-SeNP)s were located inside the bacteria cells without compromising the integrity of the bacteria. In general bacteria were more tolerant to CS-SeNPs than to selenite.

For high level of selenium exposure ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Se) the toxicity of SeNPs is highly affected by the chemical nature of the capping agent employed. The data obtained suggests that the toxicity of ethoxylated-coated SeNPs is mainly governed by the toxicity of the surfactant used for preparing SeNPs. HEC-SeNPs were mostly attached to the cell wall which may likely due to its high particle size ($101\pm 6 \text{ nm}$). As a result, it is in our opinion that capping agent is one of the most important factors to be taken into consideration when accurately evaluating the toxicological behaviour of SeNPs. Unfortunately, the coating material effect on the toxicological behaviour of NPS is either missing or not explicitly mentioned in most of the reported studies.

“Accumulation and Biotransformation of Chitosan-modified Selenium Nanoparticles in Exposed Radish (Raphanus Sativus)”

Results shown that the stable CS-SeNPs are biotransformed in exposed radish being a percentage higher 95% of CS-SeNPs into MetSeCyst and SeMet, mainly. Similar results were obtained when selenium was supplemented as selenite, which allow us to think that transformation occurs in the same manner. TEM images from the root radish system revealed the presence of CS-SeNPs on root systems, suggesting selenium transformation takes place inside radish.

I.3.3. Development of a new food packaging with antioxidant properties by incorporation of nanoparticles of selenium

“New antioxidant packaging with nano selenium as active material in a multilayer”

The antioxidant capacity of SeNPs stabilized by different compounds was studied by both the DPPH method and the free radical assay. It has been demonstrated that among the stabilizing agents tested 7% of 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate at pH 3 is the most appropriate to be added to the adhesive and to the final multilayer material with different PE thickness. An increase in nanoparticles concentration also produced an increase in the antioxidant capacity of both the solutions and the adhesives, and so, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was selected as the optimal concentration in the adhesive. Higher concentration caused a reduction of the adhesion properties. It was demonstrated that DPPH is not an appropriate method when the antioxidant, SeNPs in this case, is behind a polymeric layer, as the DPPH radical is not able to cross the plastic layer of PE and react with the antioxidant.

“Evaluation on SeNPs migration from food packaging”

For this purpose bags of $1.0 \times 1.5 \text{ dm}^2$ and PE thickness of 35, 60 and 90 nm, were filled with milled hazelnut and, stored for 10 days at 40°C . With the aim of evaluating the possible migration of SeNPs contained into a multilaminar packaging in a system (PET-adhesive+SeNPs-PE), $^{77}\text{SeNPs}$ was synthesized in order to discern exogenous selenium from the endogenous present in sample. After storage, no signal on the ^{77}Se isotope was detected when measuring selenium concentration in samples by ICPMS. Results on selenium content on hazelnut were similar and no significant

differences were found between packaging without and with adding SeNPs. Moreover, not effect of the material thickness on the SeNPs migration was observed.

1.4. CONCLUSIONS

The main conclusions obtained from this research work are summarized below:

1. **Synthesis of SeNPs can be controlled through key process factors**, such as: concentration and chemical composition of the stabilizing agent, the ratio ascorbic acid/ Na_2SeO_3 and pH. **AF⁴ technique** coupled to DAD-ICPMS has been proved as an adequate **technique for the characterization of spherical SeNPs**.

2. The use of various analytical techniques (AF⁴-DAD-ICPMS prior to SDS-PAGE separation) has allowed us to detect proteins containing selenium in the range of 10-70 kDa in the soluble protein fraction **Se-enriched yogurt when supplementing with sodium selenite**. The identification of these proteins revealed the **presence of proteins containing Met and Cys, and two other proteins with antioxidant functions as Thioredoxin and Glutaredoxin**. Unlike Se-enriched yogurts, **chaperones** were not detected in control yogurts which may indicate that selenium plays a key role in expressing these proteins and thus in reducing stress factors affecting *Lactobacillus* during lactic fermentation.

3. In the evaluation of the effects of selenite and selenium nanoparticles with different stabilizing agents on bacteria responsible for lactic fermentation processes such as *Lactobacillus bulgaricus* the following conclusions can be addressed. *L. Bulgaricus* were more tolerant to the presence of SeNPs (modified with chitosan) than inorganic selenium. This tolerance could be explained by the CS-SeNPs transformation to selenoamino acids. Toxicity of SeNPs is highly influenced by **the nature of the capping agent**.

4. ***Raphanus Sativus* when supplemented with CS-SeNPs showed high capacity of biotransformation** to organic selenium species ($\approx 95\%$). Moreover, TEM and AF⁴-

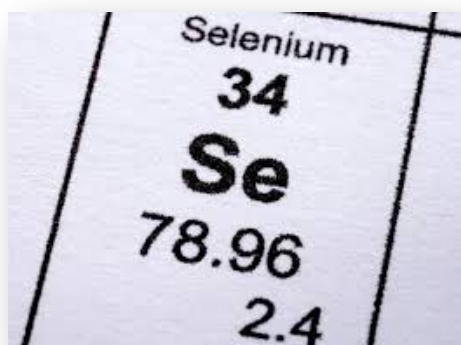
DAD-ICPMS analysis allowed us the characterization of NPs adhered on plant roots, suggesting that the transformation takes place within the plant. Similar results were obtained when plants were supplemented with sodium selenite.

5. The antioxidant capacity of SeNPs synthesized with different stabilizing agents has been evaluated by using two methods: **DPPH and free radicals**. The antioxidant capacity was measured in suspensions of SeNPs, when mixed with the adhesive and after their incorporation into packaging with different PE layer thicknesses. The best results, in terms of oxidant capacity were achieved when SeNPs were prepared by using non-ionic surfactant as capping agent. Moreover, it was demonstrated that the DPPH assay is not suitable for measuring the oxidant capacity of SeNPs suspensions. The studies about migration of SeNPs from food packaging multilayer showed that the selenium extracted were below the maximum permissible limits ($10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). The data show the **low trend of SeNPs to migrate** and, therefore ensuring the quality of food during storage.

Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.
Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes

II. INTRODUCCIÓN

I. SELENIO: Elemento Esencial para los Seres Vivos



El selenio (Se) es un elemento traza esencial para los seres vivos con importantes funciones biológicas y bioquímicas. Su deficiencia ha sido asociada con diversas enfermedades ya que presenta importantes propiedades antioxidantes, inmunológicas y tiroideas (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique 2008).

Además, está involucrado en la prevención de algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, de fertilidad, y ejerce un papel antagónico frente a los efectos tóxicos de metales como el arsénico, cadmio, mercurio y plomo.

En 1957, Schwarz *et al.* descubrieron, por primera vez, los efectos beneficiosos de este elemento, constatando que el selenio prevenía la incidencia de necrosis hepática en ratas con deficiencia en vitamina E. Sin embargo, no fue hasta el año 1973 cuando se comprobó que dicho efecto protector estaba asociado a la acción antioxidante de la selenocisteína, amino ácido presente en la enzima glutatión peroxidasa (Rayman 2000).

Desde ese momento, se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de elucidar el metabolismo de este elemento en los sistemas biológicos. A pesar de que todavía los resultados sobre el metabolismo del selenio no son definitivos, lo que sí es un hecho constatado es que los efectos del selenio no solamente dependen de su concentración, sino de la forma química en que se encuentra.

Tabla 1. Compuestos de Selenio presentes en muestras biológicas

Especie	Fórmula Química
Selenito	SeO_3^{2-}
Seleniato	SeO_4^{2-}
Seleniuro de hidrógeno	H_2Se
Metilselenol	CH_3SeH
Dimetilseleniuro	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$
Selenocistina	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenocisteína	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{SeSeCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Trimetil selenonio	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$
Selenohomocistina	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SeSeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenocistationina	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenoetionina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenocistamina	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SeSeCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Selenoadenosilselenohocisteína	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SeCH}_2\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_3\text{C}_5\text{N}_4\text{NH}_2$
Y-glutamyl-selenometilselenocisteína	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenometilselenocisteína	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$

I.1. Esencialidad del selenio: Selenoproteínas

Los efectos esenciales del selenio se deben fundamentalmente a su presencia en las proteínas. Así, el selenio puede incorporarse a las proteínas de manera específica en forma de selenocisteína (SeCys) (Aguilar *et al.* 2009); estas proteínas se denominan selenoproteínas y son las responsables de conferir a este elemento su carácter esencial. Por otra parte, el Se también puede incorporarse a las proteínas de forma no específica como selenometionina (SeMet) sustituyendo al azufre (Bierla *et al.*

2013a). Sin embargo, estos compuestos no se consideran selenoproteínas, ya que no presentan ninguna función biológica específica. Las proteínas en las que el selenio se encuentra como SeMet se denominan proteínas que contienen Se (Lopez Heras *et al.* 2011a). La mayor capacidad catalítica de las selenoproteínas en comparación con sus homólogas sulfuradas se atribuye a la extraordinaria nucleofilia del residuo SeCys, aunque se desconoce si podrían existir más factores que contribuyesen a ello (Liu & Rozovsky 2013).

Las selenoproteínas se encuentran presentes en los tres dominios de los seres vivos: bacteria, archaea y eucariota. Sin embargo, algunos de estos organismos no hacen uso de la SeCys. De hecho, las levaduras y la mayoría de plantas superiores han perdido la maquinaria para la inserción de SeCys durante el proceso evolutivo y, por consiguiente, su proteoma no posee selenoproteínas. Las selenoproteínas se pueden clasificar en dos grupos según la localización de la SeCys en la proteína. El grupo I está constituido por proteínas que poseen la SeCys localizada en la posición N-terminal del dominio función, a este grupo pertenecen la Glutación Peroxidasa (GPx) y la selenoproteína W. Mientras que a el grupo II pertenecen aquellas selenoproteínas donde la SeCys se encuentra en el extremo C-terminal, como sucede en la familia de la Tiorredoxinas Reductasas (TrX). Hasta la fecha, se han descrito varios tipos de selenoproteínas, aunque se desconocen muchas de sus funciones. En la tabla se recoge un resumen de las selenoproteínas mejor caracterizadas hasta la fecha.

Tabla 2. Selenoproteínas: Tipos y funciones

Selenoproteínas	Funciones	Desorden	Observaciones	Referencias
Glutación peroxidasa (GPx) Presenta seis isoformas en mamíferos: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 y GPx6. GPx1, GPx2 y GPx3 son antioxidantes y se encuentran en citosol, tracto	- Estrés oxidativo - Expresión de genes virales	- Enfermedades cardiovasculares - Cáncer - Epilepsia - Desórdenes inmunológicos - Enfermedad de Keshan - VIH	GPx3 es considerada un bio-indicador del estado de selenio, correlacionado con la nutrición.	(Rayman 2009; Hoffmann 2007)

intestinal y
plasma,
respectivamente.

GPx4 (fosfolípido
hidroperóxido
glutación
peroxidasa)
reduce
específicamente
los ácidos grasos
hidroperóxidos a
fosfolípidos.

<p>Tiorredoxina reductasas (TRxRs)</p> <p>Presenta tres isoformas en mamíferos: citosólica TRxR1, mitocondrial TRxR2, y TGR expresada en los testículos.</p>	<p>- Estrés oxidativo - Expresión de genes virales</p>	<p>- Cáncer - HIV</p>	<p>El sistema TRx se encuentra sobre-expresado en muchos tumores y líneas celulares cancerígenas; considerándose como objetivo en la terapia contra el cáncer. TRxR2 ha sido la única selenoproteína encontrada en <i>C. elegans</i>.</p>	<p>(Anestål et al. 2008; Buettner et al. 1999; Beckett & Arthur 2005)</p>
<p>Iodotironina deydinasas (DIOs)</p> <p>Presenta tres isoformas en mamíferos: D1, D2 y D3</p>	<p>Producción de hormona tiroidea</p>	<p>- Enfermedad Kashin-Bech - Disfunción tiroidea</p>		<p>(Köhrle 2000)</p>
<p>Selenoproteína P (SelP)</p> <p>Proteína más abundante en plasma</p>	<p>- Estrés oxidativo - Destoxificación de metales</p>	<p>- Cáncer - Neurodegeneración - Alzheimer</p>	<p>SelP es considerada como un bio-indicador del estado de selenio, correlacionado con la nutrición.</p>	<p>(Burk & Hill 2005; Scharpf et al. 2007; Press & Tappel 1982; Bellinger et al. 2009)</p>

			La expresión de SelP en cerebro puede aumentar con la edad.	
Selenoproteína W (SelW)	-Estrés oxidativo	-Desorden muscular: enfermedad del músculo blanco -Neurodegeneración	SelW mRNA se encuentra altamente expresado en el desarrollo del sistema nervioso central.	(Squires & Berry 2008; Gu et al. 2000)
Localizado en compartimentos citosólicos				
Selenofosfatasa sintetasas (SPSs)	Síntesis de selenoproteínas	Disfunción tiroidea	SPS2 es la única proteína implicada en la síntesis de SeP (selenio fosfato, el selenio donador necesitado para la síntesis de selenocisteína). SPS1 tiene un papel no relacionado con selenoproteínas.	(Gladyshev et al. 1998)
SPS1 y SPS2 se presentan en vertebrados e insectos, SPS1 es considerada como la única selenoproteína.				
Sep15 (selenoproteína 15 kDa)	Eliminación de proteínas desplegadas desde la membrana de RE	-Cáncer	El desarrollo de cancer ha sido relacionado con polimorfismos en la Sep15.	(Kumaraswamy et al. 2000; Jablonska et al. 2008; Panee et al. 2007)
Presente en un complejo con UDP-glucosa: glicoproteína glucosiltransferasa (UGTR), una proteína localizada en el retículo endoplásmico (ER) de células mamarias.				
SelH (selenoproteína H)	-Factor de transcripción. -Regulación de selenoproteínas en respuesta a estrés.	???		(Horibata & Hirabayashi 2007)
Se encuentra en el núcleo celular. Unión de DNA a proteínas.				

I.2. Relevancia Biológica del Selenio. Efecto antioxidante y anticarcinogénico. Estados carenciales de selenio.

Una de las funciones más conocidas del selenio es su capacidad antioxidante. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un producto inevitable del proceso de respiración celular, causado por la oxidación de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Los daños causados por ROS son causas subyacentes de enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas, inmunológicas y cáncer (Battin *et al.* 2006; Zimmerman *et al.* 2015). Para evitarlo, en la medida de lo posible, las células poseen sofisticados sistemas regulatorios antioxidantes con el fin de mantener los niveles adecuados de especies reactivas de oxígeno. Algunos compuestos con carácter antioxidante son los polifenoles, compuestos azufrados y el selenio. Todos ellos forman parte de enzimas o proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y micronutrientes como las vitaminas C y E (Battin & Brumaghim 2009a).

El selenio presenta diversos efectos beneficiosos para la salud y está relacionado con la prevención o curación de determinadas enfermedades. Estos efectos beneficiosos están estrechamente relacionados con la función antioxidante de las selenoproteínas. El organismo posee sistemas de regulación de especies oxidantes que requieren, para su correcto funcionamiento, una ingesta adecuada de selenio; la dosis diaria de selenio recomendada es de aproximadamente $55 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$ (Pedrero & Madrid 2009) y, su principal fuente en los humanos es a través de la dieta. En los últimos años se han realizado multitud de ensayos, tanto *in vitro* como ensayos clínicos, para determinar los efectos del selenio en la salud, con el objetivo por una parte de establecer su papel en el tratamiento y/o prevención de determinadas enfermedades, y por otro evaluar las consecuencias generadas por estados deficitarios de selenio.

El sistema inmune es uno de los más afectados por el estrés oxidativo y donde las selenoproteínas juegan un papel importante; observándose, que la suplementación con Se, incluso en individuos con niveles adecuados, presenta un efecto estimulador del sistema inmune (Tapiero *et al.* 2003). Este efecto es especialmente importante en personas mayores, y enfermos de cáncer en tratamiento, puesto que su respuesta

inmune se ve frecuentemente comprometida (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique 2008). Estudios realizados con ancianos en el estado de Arizona evidenciaron que una suplementación con $400 \mu\text{g Se}\cdot\text{día}^{-1}$, en forma de levadura selenizada, incrementaba hasta en un 27% el número de linfocitos T, principales responsables de coordinar la respuesta inmune celular (Wood *et al.* 1999).

El estrés oxidativo ha sido también relacionado con estadios iniciales y avanzados del VIH, induciendo la apoptosis de linfocitos T. En estudios *in vitro* se ha puesto de manifiesto la dependencia existente entre los niveles de interleuquina (responsable de la temprana y más rápida expansión de linfocitos T) con la suplementación de Se y, contribuyendo de esta forma, a aumentar la defensa enzimática y una mejora generalizada de la salud de estos pacientes (Tapiero *et al.* 2003). En cuanto a otras enfermedades autoinmunes como la tiroiditis, se ha observado que la suplementación de Se produce un efecto beneficioso tanto en casos de hipo- como de hipertiroidismo (Negro 2008; Horowitz *et al.* 1994).

Las selenoproteínas también intervienen en la maduración del espermatozoide y actúan como componente estructural, por ello una actividad correcta de los espermatozoides está relacionada con unos niveles adecuados de selenio (Rezvanfar *et al.* 2013).

En lo que respecta al papel del Se en la prevención de enfermedades coronarias, los datos de los que se disponen son contradictorios. Nuevamente el efecto del selenio está relacionado con el papel de las selenoproteínas en la prevención de la oxidación lipídica, inhibición de la agregación plaquetaria y reducción de la inflamación. La suplementación con selenio no conlleva necesariamente una mejora en la incidencia de enfermedades coronarias. Esto podría explicarse con una relación en forma de U entre el estatus del Se y las enfermedades cardiovasculares, es decir, a partir de una concentración de selenio donde la actividad de las selenoproteínas ya es la óptima, el aporte extra de Se dejaría de suponer un beneficio (Rayman 2012).

En el sistema nervioso, el Se juega un papel importante en la actividad cerebral, por ello ante estados carenciales recibe un aporte prioritario a expensas de otros órganos. En algunos estudios, su administración en concentraciones superiores a $200 \mu\text{g Se}\cdot\text{día}^{-1}$, supuso una mejora del estado de ánimo de los participantes, disminuyendo la ansiedad y confusión e incrementando la lucidez, serenidad y confianza. Además, la suplementación con Se ha demostrado ser beneficiosa en enfermedades como la epilepsia, senilidad, depresión y problemas cognitivos (Finley & Penland 1998).

En la figura 1 se muestran algunos de los compuestos de selenio con propiedades antioxidantes.

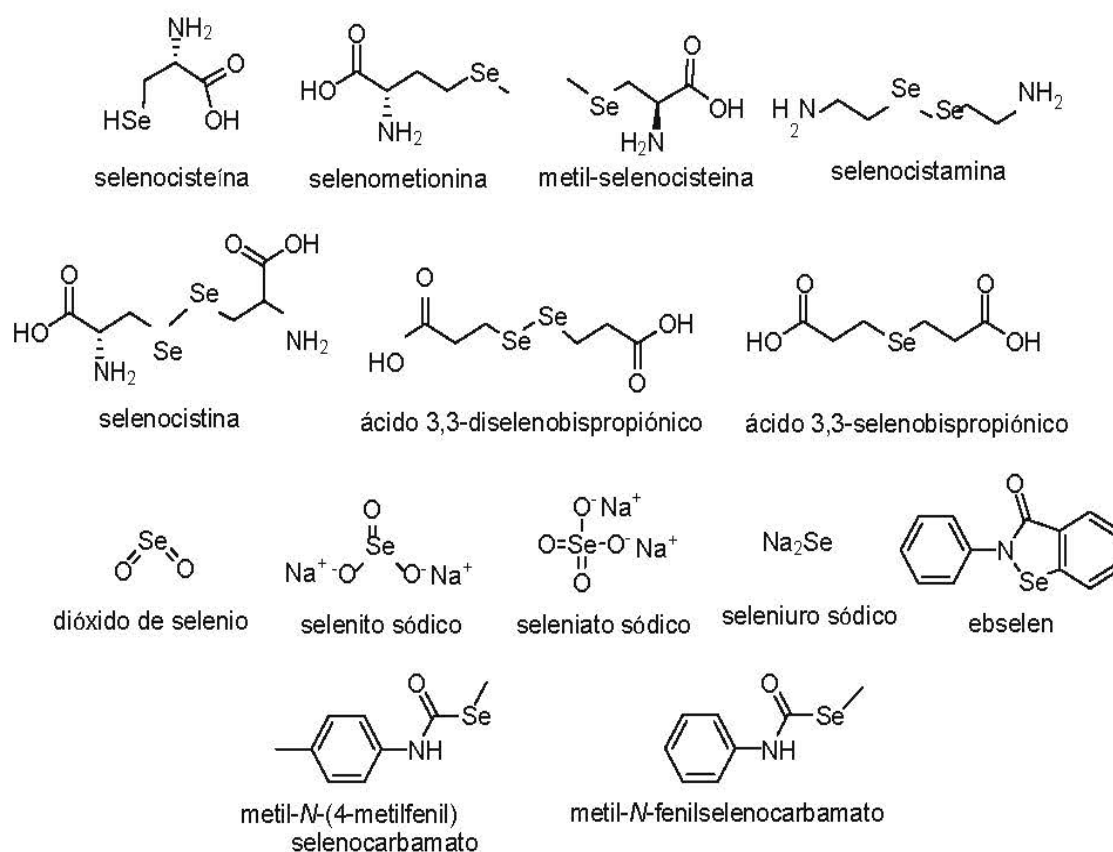


Figura 1. Compuestos de selenio con propiedades antioxidantes

El papel del selenio frente a la prevención de ciertos tipos de cáncer es quizá el aspecto que más interés ha suscitado en la comunidad científica debido a la necesidad de tratamientos para su prevención o tratamiento. Sin embargo, es también uno de los aspectos que más polémica han originado por los resultados contradictorios obtenidos

en diferentes estudios (Roman *et al.* 2014). En estudios realizados con animales de experimentación se ha puesto de manifiesto que la deficiencia de este elemento conduce a propensión carcinogénica en una gran variedad de tejidos. Dicha susceptibilidad puede ser prevenida con la suplementación de dietas con un contenido de Se supranutricional. El efecto quimiopreventivo de este elemento (suministrado en dosis elevadas) se ha mostrado efectivo en la disminución de la incidencia de cáncer de hígado, pulmón, colon, ovarios, próstata y páncreas (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique 2008).

Con el objetivo de verificar esta hipótesis se han llevado a cabo varios estudios en humanos. En este tipo de estudios es primordial una correcta evaluación de los niveles de Se basales de las poblaciones, ya que en algunos casos la suplementación con Se puede ocasionar efectos perjudiciales. Entre estos trabajos cabe destacar el realizado con individuos de una población de China, donde el 15% de sus habitantes son propensos a padecer carcinoma hepatocelular. Las personas que fueron suplementadas con Se (levaduras selenizadas) no desarrollaron cáncer en los cuatro años posteriores, a diferencia de varios individuos pertenecientes al grupo control, a los que se le suministró tabletas placebo (Yu *et al.* 1999). Además, se conoce que las personas con niveles de Se en sangre inferiores a $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ poseen un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, próstata y colon (Battin & Brumaghim 2009b; Aguilar *et al.* 2009).

Aunque la actividad anticarcinogénica del Se ha sido relacionada con ciertos metabolitos de selenio, los mecanismos implicados no han sido completamente elucidados. La absorción y distribución de selenio en los tejidos, así como su capacidad en la prevención del cáncer, depende de la dosis y de la forma química en que es suministrado. Se ha demostrado que la especie metilselenol y otras especies monometiladas son efectivas en la prevención del cáncer (Tapiero *et al.* 2003). En muchos estudios se ha atribuido a la especie SeMeSeCys, fácilmente metabolizada a metilselenol, su efecto protector frente a distintos tipos de cáncer. Esta mayor efectividad se ha puesto de manifiesto en la prevención del cáncer de mama en ratas al comparar los resultados obtenidos con el suministro de otros compuestos de Se más estudiados, como la SeMet. Otros compuestos de Se, no utilizados en la síntesis de

selenoproteínas, también han mostrado efectos anticancerígenos. Entre ellos, se encuentran compuestos aromáticos como el trifenilselenonio (Whanger 2004), y varios alquil y aril selenocianuros (Hu *et al.* 2010). En un estudio reciente, desarrollado por Zhang y col. (Zhang 2001), se ha observado que la expresión de proteínas oncogénicas y supresoras del cáncer de próstata está directamente relacionada con la especie de selenio suplementada. Mientras que el Se(IV) y la SeMet modificaron la expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo cancerígeno en ratones portadores, la especie SeMeSeCys se asoció con la reducción de los riesgos asociados a este tipo de cáncer.

El efecto anticarcinogénico del selenio se ha atribuido a diferentes mecanismos: (i) modulación del proceso de división celular (Lopez-Heras *et al.* 2014); (ii) alteración metabólica de algunas sustancias carcinogénicas; (iii) proliferación celular contra el daño oxidativo por un aumento de la actividad de la selenoproteína TRx (Wang *et al.* 2014); (iv) estimulación del sistema inmune (Negro 2008); (v) inhibición de la actividad de enzimas hepáticas, cuya actividad metabólica permite la producción de sustancias tóxicas que inducen cáncer (Ren *et al.* 2013); (vi) activación de enzimas destoxificantes en hígado.

Las selenoproteínas que tienen una función antioxidante (GPx, TR, ID, etc.) podrían estar implicadas en la prevención del cáncer. Sin embargo, aún no está completamente establecido si la actividad anticarcinogénica del selenio es atribuible exclusivamente a la actividad de las selenoproteínas (Hatfield & Berry 2003). En un reciente estudio se ha demostrado que algunas selenoproteínas parecen tener una “doble cara” respecto a la prevención de cáncer. Donde las selenoproteínas TRx1 y Sep15 ejercen una función anticancerígena en células normales, en células malignas se ha visto el efecto contrario. En estudios *in vivo* también se ha demostrado que la deficiencia de algunas selenoproteínas puede inhibir el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Una teoría que podría justificar este efecto contradictorio entre el estatus de Se y el riesgo de padecer cáncer está relacionada con los niveles de Se en los individuos, sugiriendo una relación en forma de U, análogamente como sucede con el efecto antioxidante y protector frente a otro tipo de enfermedades. Uno de los estudios que avalan esta hipótesis se basan en la suplementación de Se y su relación con el cáncer de pulmón, donde la tasa de padecer esta enfermedad en una población

disminuía para un nivel de Se en suero inferior a $106 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que para dosis de Se suplementado superiores a $121.6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dicha tasa sufría un incremento (Roman *et al.* 2014).

I.2.1. Efecto de la deficiencia de selenio.

El principal aporte de Se en humanos es a través de la dieta. El contenido de selenio en vegetales y, por tanto, en animales está relacionado con la concentración y biodisponibilidad del mismo en el suelo (Tapiero *et al.* 2003). En regiones donde la concentración de selenio en el suelo es baja (Corea del norte, Europa del este, Nueva Zelanda, Nepal, Tíbet, África central y República del Congo) se han observado enfermedades que han sido asociadas a estados carenciales de este elemento y que, en algunos casos, han llegado a ser endémicas (Rayman 2012; Zhang & Spallholz 2009).

Los estudios más completos en relación con las enfermedades asociadas a estados carenciales de selenio, se han llevado a cabo en China en 1980 donde se realizó un estudio de los niveles de Se en los cultivos (Chen *et al.* 1980). Los niveles deficitarios de selenio en suelos y cultivos fueron asociados con la incidencia de dos enfermedades, la “enfermedad de Keshan” y la “enfermedad de Kashin-Beck”.

La enfermedad de Keshan se identificó por primera vez en 1935, entre los habitantes de una región rural de China a la que debe su nombre, y originada por la escasa ingestión de selenio en la dieta. Esta región se caracteriza por el extremadamente bajo contenido de selenio y yodo en el suelo. Es una cardiopatía endémica que aparece en mujeres en edad fértil y niños, donde la cantidad de selenio ingerida es del orden de $10 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$. La baja concentración de selenio en la sangre y el pelo se correlacionaron con la incidencia de la enfermedad. Esta enfermedad endémica llegó a alcanzar en los años 40 un índice de mortalidad del 80%. La suplementación de selenio resultó ser efectiva disminuyendo drásticamente la tasa de mortalidad hasta el 30% (Negro 2008) y, confirmando así la relación de este elemento con la aparición de la enfermedad (Chen 2012).

La enfermedad de Kashin-Beck se ha identificado en zonas de China, Liberia y Tíbet. Se trata de una osteoartropatía degenerativa que provoca atrofia, degeneración

y necrosis de los cartílagos, y afecta fundamentalmente a las extremidades. Esta enfermedad se inicia en la infancia y pubertad y, continúa hasta que cesa el crecimiento del individuo (Rayman 2000). La concentración de selenio en orina y plasma sanguíneo de pacientes con esta enfermedad es de $11 \mu\text{g Se}\cdot\text{L}^{-1}$, frente a $60\text{-}100 \mu\text{g Se}\cdot\text{L}^{-1}$ encontrados en los mismos fluidos biológicos en individuos de zonas colindantes donde no hay deficiencia de este elemento. La causa de esta enfermedad no está completamente esclarecida, pero se ha observado una mayor incidencia en regiones deficientes en yodo y selenio simultáneamente, por lo que se relaciona con deficiencias de estos elementos (Xia *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2009). La influencia de otros factores como la presencia de micotoxinas y productos de descomposición del suelo, se sugiere que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad.

Del mismo modo, la deficiencia de selenio podría favorecer el desarrollo de enfermedades causadas por otros factores, como por ejemplo el bocio y el creatinismo, las cuales son consideradas enfermedades derivadas principalmente de la deficiencia de yodo y, que en estudios llevados a cabo en la región de África central, se ha encontrado una mayor prevalencia de estas enfermedades en zonas con bajo contenido de Se en suelo respecto a zonas con elevada concentración del mismo (Aguilar *et al.* 2009; Gao *et al.* 2014).

El importante papel del selenio en multitud de funciones biológicas hace que sea crucial una ingesta adecuada de este elemento para un buen funcionamiento del organismo. La deficiencia de Se puede disminuir la expresión de las selenoproteínas, afectando a los procesos biológicos en los que están involucradas, y dando lugar a la aparición de enfermedades (Hatfield & Berry 2003). En estados carenciales moderados, el Se se incorpora preferentemente a las selenoproteínas con mayor importancia biológica, manteniendo un nivel de Se lo más óptimo posible en determinados órganos, como el cerebro, sistema endocrino y reproductor, generando una disminución del contenido de Se en órganos como el corazón y músculo esquelético (Pedrero & Madrid 2009). En esta línea, la ingesta de suplementos nutricionales y alimentos enriquecidos en Se posibilita que se pueda revertir esta situación, y la recuperación parcial o total de las enfermedades producidas por la deficiencia de Se (Tapiero *et al.* 2003; Rayman 2012).

La sintomatología de enfermedades asociadas a estados carenciales de Se no es exclusiva de humanos, también han sido detectados casos en animales en áreas con baja biodisponibilidad de este elemento, originando la enfermedad conocida como “la enfermedad del músculo blanco” (Seppälä *et al.* 2014). Aunque los casos de deficiencia severa de selenio son escasos en la actualidad, la deficiencia de selenio en ganado bovino provoca síntomas como: debilidad muscular del recién nacido, baja ganancia de peso, diarrea o disminución de la fertilidad. Además, el bajo contenido de este elemento en la leche de vaca (por debajo de $0,15 \text{ mg Se} \cdot \text{kg}^{-1}$ en peso seco) producida en las granjas orgánicas, en comparación con la leche no orgánica (promedio $0,23 \text{ mg Se} \cdot \text{kg}^{-1}$ en peso seco) refleja el bajo nivel de selenio en piensos, en ausencia de suplementos nutricionales que aminoren esta carencia (J.R. Liu, M.J. Chen 2005). La suplementación conjunta de Se y vitamina E favorece la migración de células polimorfonucleares, las cuales actúan en la defensa contra la mastitis en el ganado (Hatfield & Berry 2003). Teniendo en cuenta los altos costos de cada caso de mastitis clínica (270-670 € en el caso de vacas productoras) (Stiles & Holzapfel 1997; Farrell *et al.* 2004), los beneficios de un suministro suficiente de selenio son evidentes. La suplementación de selenio en las granjas es en la actualidad una práctica común.

1.2.2. Efecto de los elevados niveles de selenio: Selenosis

En sus orígenes el selenio fue considerado un elemento tóxico, ya que los primeros efectos observados de este elemento fueron perjudiciales para la salud. La toxicidad por selenio fue descrita por primera vez en caballos por Marco Polo durante el viaje de la "Ruta de la Seda" hacia China (Zhang & Spallholz 2009). Una descripción similar de los síntomas de toxicidad dados por Marco Polo, fueron también observados en caballos en el oeste de los Estados Unidos en zonas seleníferas de Dakota y Nebraska a finales de 1800. Dichos síntomas incluían la caída del pelo de la cola y afecciones necróticas en las pezuñas. Sin embargo, no fue hasta 1930 cuando se asoció la causa de dicha enfermedad a la ingesta de plantas seleníferas presentes en el suelo de la región (Hatfield & Berry 2003). A estas enfermedades se las conoce como “enfermedad alcalina” o “vértigo ciego”. Poblaciones de países como Venezuela, Canadá, Japón, Estados Unidos y algunas regiones de China presentan altas cantidades

de Se en plasma, directamente relacionados con el contenido de este elemento en el suelo (Rayman 2012).

También se han observado casos de toxicidad por selenio en pescados y aves acuáticas, principalmente en lagos de Carolina del Norte, Colorado y Texas, en la década de 1980. Los síntomas de toxicidad incluían una notable disminución de la reproducción, trastornos patológicos e incluso la extinción de algunas especies (Pedrero & Madrid 2009).

Afortunadamente, los casos de toxicidad por selenio en humanos son realmente escasos y los problemas asociados a la toxicidad del selenio son en general, mucho menores que los relacionados con su deficiencia (Whanger 2004). Los síntomas de selenosis son: anorexia, dolor abdominal, diarrea, fatiga, irritabilidad, depresión, caries dental y edema pulmonar; estos efectos pueden ser reversibles al interrumpir la exposición al selenio. La exposición ocupacional es la principal vía de intoxicación con selenio. La mayor población de riesgo la constituyen los trabajadores de las industrias de selenio y fundiciones de cobre, donde se han detectado casos de envenenamiento por inhalación de especies volátiles como SeO_2 , SeOCl_2 y SeH_2 . Sorprendentemente, los primeros casos de selenosis crónica detectados en humanos se detectaron en la región de Hubei, zona adyacente al área deficitaria de Se de Sichuan en China, donde los suelos contenían cerca de $8 \text{ mgSe} \cdot \text{Kg}^{-1}$ (Chen et al. 1980).

Existe cierta controversia sobre la concentración de Se que debería fijarse como adecuada pero no tóxica (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique 2008). Esto es debido a que la toxicidad de este elemento depende de la forma química, forma de administración, tiempo de exposición, estado fisiológico, organismo, interacción con otros metales, etc. En general, se habla de una mayor toxicidad aguda de las especies inorgánicas de selenio frente a las orgánicas, aunque en humanos no se hayan encontrado evidencias de ello, siendo el selenito ligeramente más tóxico que el seleniato. De forma general, el proceso de metilación es una forma de destoxificación justificado por el hecho de que de todas las formas químicas del Se, es el compuesto dimetilseleniuro el que presenta menor toxicidad (al menos 200 veces) que otras especies inorgánicas y seleno aminoácidos (Francesconi & Pannier 2004). La rápida

excreción de este compuesto en ratas, en torno al 71-79%, es indicativo de ser un posible producto metabólico de destoxificación inerte. En la figura 2 se muestra de manera general los mecanismos y compuestos implicados en el proceso de toxicidad/destoxificación del selenio.

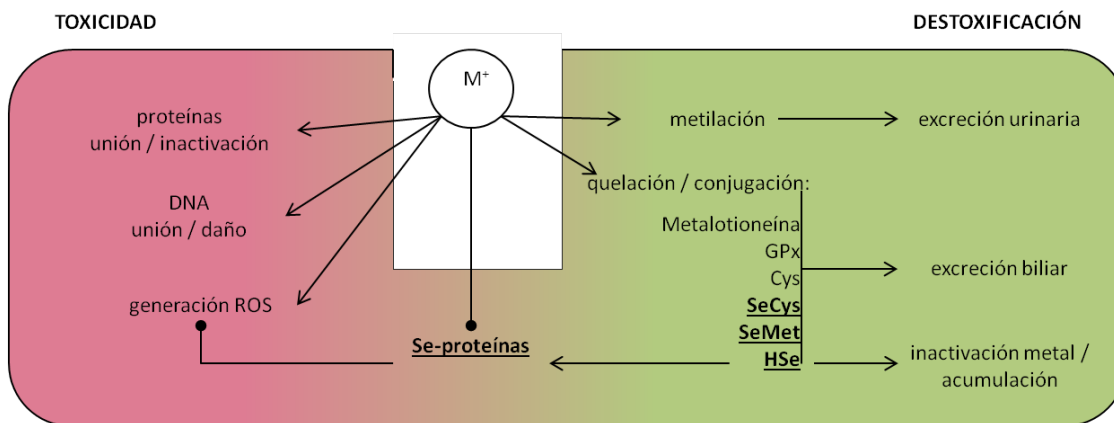


Figura 2. Esquema general de mecanismos de toxicación y destoxificación de selenio exógeno

I.3. El Selenio en los Alimentos

I.3.1. Fuentes de selenio en la dieta

En la actualidad no hay dudas sobre los efectos beneficiosos del selenio para la salud, sin embargo, como se ha comentado anteriormente éstos dependen, entre otros factores, de la concentración y forma del elemento. El intervalo de concentraciones de selenio para que sea considerado deficiente, esencial o tóxico es muy estrecho. Se estima que la ingestión de alimentos con concentraciones inferiores a $0.1 \text{ mgSe} \cdot \text{kg}^{-1}$ puede dar lugar a estados carenciales y por encima de $1 \text{ mgSe} \cdot \text{kg}^{-1}$ causar toxicidad.

La principal forma de incorporación de selenio en los seres humanos es a través de la dieta. La cantidad diaria recomendada de selenio (Recommended Dietary Allowance, RDA) no posee un valor fijo y difiere en función del país, edad y sexo (Rayman 2012). La estimación de estos valores por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos no ha sido estable y ha variado con los años, dependiendo del conocimiento sobre los efectos beneficiosos de este elemento. En el año 1980, se

estimaba que los valores de selenio seguros y adecuados en la ingesta diaria (ESADDI Estimated Safe and Adequate Daily Dietary Intakes) para adultos, oscilaban entre 50 y 200 $\mu\text{g Se}$. Estos valores fueron calculados extrapolando resultados obtenidos en experimentos con animales, dado que en ese momento no existían datos disponibles de estudios en humanos. En la actualidad el valor recomendado es 55 $\mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$ para adultos de ambos sexos (National Research Council 2000), y fue determinado teniendo en cuenta la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en experimentos realizados en poblaciones de China y Nueva Zelanda; mientras que la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (Aesan 2011) distingue entre sexos y recomienda entre 55 y 70 $\mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$ para hombres y mujeres, respectivamente.

En general, el valor seguro y necesario de selenio se estima teniendo en cuenta los requerimientos de selenio necesarios para una completa expresión de las selenoproteínas que sirven como biomarcadores del estatus de selenio: GPx3 y SeLP (Ballihaut et al. 2011). Así, mientras que la GPx3 necesita sólo 35 $\mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$ para alcanzar su actividad óptima, la SeLP requiere de 49 $\mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$.

Como se ha mencionado anteriormente, la principal ruta para la entrada de Se en el organismo es a través de la dieta, siendo la contribución del agua y aire despreciable. La cantidad total de Se es prácticamente dependiente del tipo de comida y composición; siendo los alimentos que más contribuyen a la ingesta de selenio el pan, cereales, carne, pescado, huevos y productos lácteos. Una estimación de los niveles de Se en los diferentes alimentos se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de selenio en alimentos con elevado contenido en este elemento

Alimento	$\mu\text{g Se}$ por ración de alimento
Nueces de Brasil (ración = 28 g)	544
Pescado (ración = 85 g)	40 – 92
Carne (ración = 85 g)	18 – 28
Cereales (ración = 100 g)	13 – 50
Productos lácteos (ración = 125 g)	8 – 20
Vegetales y frutas (ración = 130 g)	≤ 10

El nivel de Se en cereales está directamente relacionado con su nivel en el suelo de cultivo, quedando su biodisponibilidad condicionada por las condiciones físico-químicas del mismo como: pH, potencial redox, salinidad y presencia de materia orgánica (Intawongse & Dean 2006). Los cereales son una importante fuente de ingesta de Se a nivel mundial; sin embargo, la presencia de este elemento es generalmente bajo debido a que este tipo de plantas no requieren la presencia de Se para su crecimiento, y no presentan acumulación de este elemento bajo condiciones fisiológicas normales (Cubadda *et al.* 2010; Hart *et al.* 2011). Otros vegetales pertenecientes a la familia *Allium*, entre los que se incluyen los ajos y cebollas, pueden acumular importantes cantidades de Se, pudiendo alcanzar concentraciones superiores a 67 y 96 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente (Roman *et al.* 2014). El selenio también puede acumularse en elevadas concentraciones en otros tipos de vegetales como setas y brócoli. Sin embargo, el alimento con mayor concentración de selenio son las nueces de Brasil, las cuales tienen una concentración media superior a 83 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Dumont *et al.* 2006).

En productos animales, el nivel de Se refleja los niveles de Se presentes en el pienso animal. En carnes, huevos y particularmente pescado (Pedrero & Madrid 2009), los cuales son ricos en proteínas, el contenido de Se es relativamente alto 49–739 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Además, determinados órganos (Bierla, Szpunar, *et al.* 2008) como riñón e hígado, pueden presentar niveles especialmente altos de este elemento, incluso por encima de 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. En general, la concentración total de Se presente en los alimentos está directamente relacionado con las condiciones del suelo, por ello la ingesta de este elemento en la dieta varía ampliamente con la localización geográfica.

Un aspecto fundamental a destacar, es que los distintos tipos de alimentos proporcionan Se en distintas formas químicas, que a su vez implican una biodisponibilidad diferente del elemento. Los compuestos de selenio mayoritarios en vegetales son SeMet y SeO_4^{2-} / SeO_3^{2-} y, como especies minoritarias la SeCys, SeMeSeCys y γ -glutamyl-selenometilselenocisteína (Palomo-Siguero *et al.* 2014; Montes-Bayón *et al.* 2002). La SeMet y SeCys son las principales especies de selenio en productos de origen animal, con proporciones muy variables dependiendo de la

dieta de los animales (Bierla, Dernovics, *et al.* 2008). En general, la distribución de las especies de Se en los alimentos varía considerablemente dependiendo de las especies de plantas / animales y las condiciones de crecimiento (sin o con suplementación de selenio). Cada compuesto de selenio se caracteriza por tener rutas de absorción y/o asimilación específicas, así como eficiencias, y por lo tanto el análisis de especiación de Se en los alimentos es un requisito clave para describir con precisión la relación entre la ingesta y el estado de salud, sobre todo, cuando se trata de la administración de suplementos.

I.3.2. Aumento del estatus de selenio:

Desarrollo de alimentos funcionales y biofortificación de cultivos

La necesidad de alcanzar los valores necesarios de selenio en la dieta, ha impulsado el campo de investigación relacionado con el desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos con este elemento y con procesos de biofortificación de cultivos.

Un alimento funcional puede ser definido como aquel, que además de satisfacer las necesidades básicas de nutrientes y manteniendo sus características organolépticas, proporciona beneficios para la salud o disminuye el riesgo de contraer determinadas enfermedades, aunque no existe actualmente un consenso para la definición de este término. El diseño de alimentos funcionales implica la incorporación de ingredientes, eliminación de constituyentes no deseados o el incremento de la concentración de un determinado componente (micronutrientes) (Rayman 2005). Siendo el objetivo de estos alimentos prevenir y no curar, ya que no son fármacos. El desarrollo de los mismos es una de las áreas de mayor crecimiento científico dentro del campo de la tecnología alimentaria y biotecnología como queda de manifiesto, ya que desde el año 1970 hasta el 2007 se han publicado del orden de 2400 artículos relacionados con esta temática, el 80% de ellos con posterioridad al año 2000. Asimismo, y según datos del informe de la Organización Nacional de Consumidores, en la actualidad los alimentos funcionales constituyen en España del 15 al 20% del

mercado nacional de alimentos, siendo los lácteos funcionales los de mayor expansión. La entrada en vigor del Reglamento (CE)1924/2006 del Parlamento Europeo relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos (Parlamento Europeo 2006) regula la comercialización de los alimentos funcionales, prohibiendo hacer alegaciones terapéuticas y curativas, y establece que las declaraciones que aparecen en los productos deben ser comprendidas por el consumidor, penalizando mensajes engañosos.

Como se ha indicado anteriormente, uno de los alimentos funcionales de mayor consumo son los lácteos funcionales. Muchos de ellos se producen a través de un proceso de fermentación láctica que implica la presencia de bacterias lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son un grupo de bacterias gram-positivas no patógenas que se emplean en la producción de muchos productos alimentarios fermentados y bebidas, entre los que se incluyen los productos lácteos. Son las encargadas de transformar la glucosa en ácido láctico.

Las bacterias *Lactobacillus Bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus*, responsables de la fermentación de la leche, ya eran conocidas, hacia el 6000 o 7000 A. C, por los tracios que vivían en la actual Bulgaria. Fueron ellos quienes las utilizaron para inducir la fermentación de la leche de oveja y de esa forma obtener yogurt, queso, etc. dichos productos son los primeros alimentos probióticos en el mundo. Dada la importancia de esta industria, en concreto de la manufactura de yogurt, el genoma de *Lactobacillus Bulgaricus* ha sido incluso estudiado (Hao *et al.* 2011) con el objetivo de evaluar diferentes parámetros y establecer las modificaciones más oportunas para conseguir un producto con mejor calidad.

Por otra parte, muchos estudios científicos indican que LAB juegan un papel importante en la protección de la salud humana y animal debido a su efecto antimicrobiano, inmunomodulador, actividad anticancerígena, antidiarreicos, antialérgicos y antioxidantes (Mrvčić *et al.* 2012). En los últimos años se ha evaluado la capacidad de LAB para unirse a metales, con el fin de utilizar estas bacterias como

vehículo para incorporar elementos esenciales a la dieta (Mrvčić *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2009).

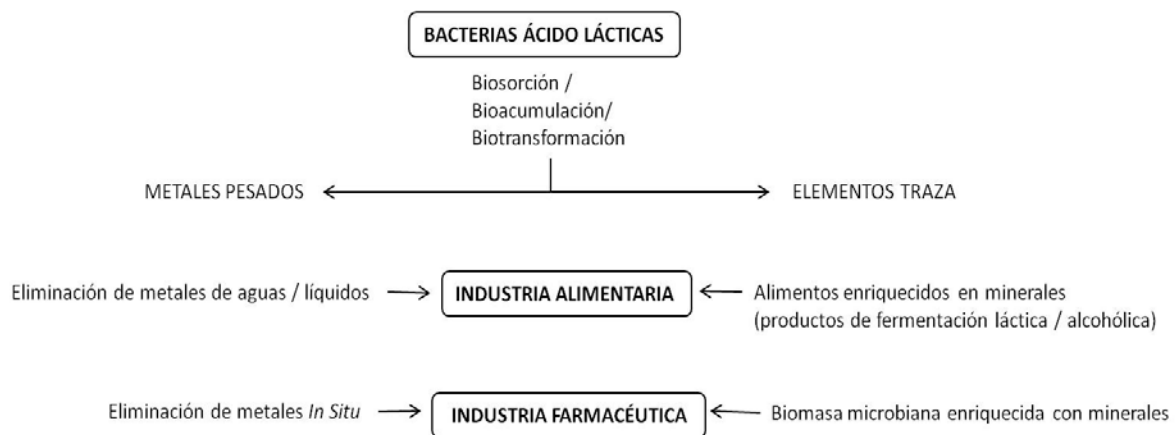


Figura 3. Aplicación de LAB en procesos de unión a metales en la industria alimentaria y farmacéutica.

Los elementos traza se unen a LAB, así como a otros microorganismos, en un proceso complejo que depende de varios factores: de las características físico-químicas del elemento, de las propiedades fisiológicas de las cepas de LAB y de las características físico-químicas del medio (pH, temperatura, nutrientes, concentración). Existen dos mecanismos básicos para la unión del elemento traza a bacterias: i) bioadsorción- proceso pasivo no mediado metabólicamente y que implica la unión del elemento a la pared celular de LAB y, ii) bioacumulación – conlleva asociado un proceso metabólico en el que los elementos pasan a través de la pared bacteria y se acumulan dentro de la misma. El mecanismo de unión de metales y no metales a LAB no difiere de los mecanismos presentes en otros tipos de bacterias (Vijayaraghavan & Yun 2008), pero viene influenciado por el género y especie bacteriana implicada. En la figura 4 se muestra el esquema de algunos procesos de unión de metales a las bacterias.

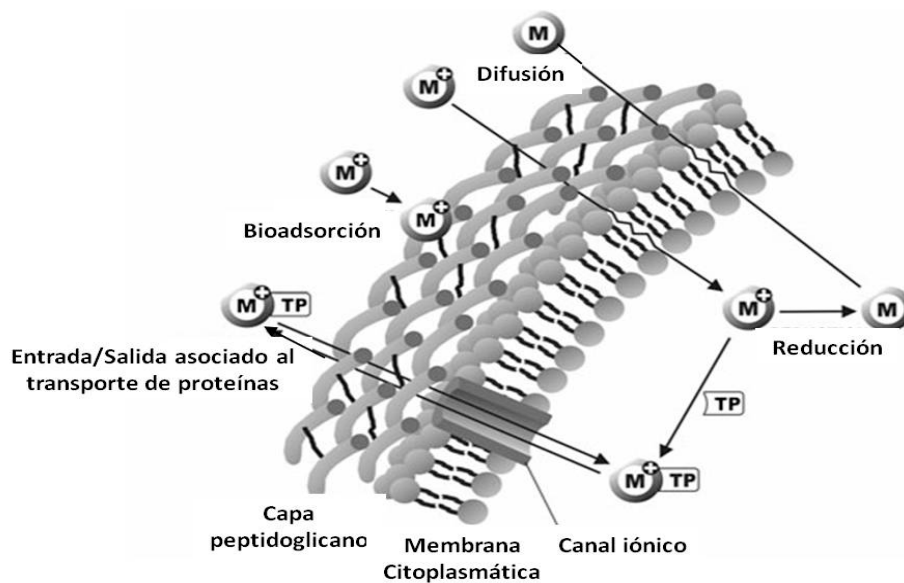


Figura 4. Mecanismos de la unión a metales por microorganismos

El selenio es acumulado por varias especies de *Lactobacillus*: *Bulgaricus* (Iang 2007), *Casei Rhamnosus* (Araúz, Afton, Wrobel, J. a Caruso, et al. 2008) y *Brevis* (Yazdi et al. 2013). En líneas generales, el selenio se suministra en el medio de cultivo en forma inorgánica (Na_2SeO_3) y, una vez incorporado a la bacteria puede biotransformarse a especies orgánicas de selenio o a selenio metálico (Alzate et al. 2007; Alzate et al. 2008).

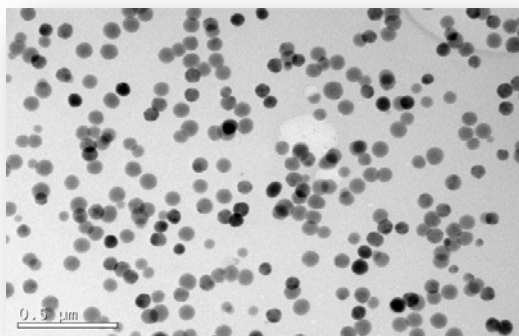
De manera general, las bacterias ácido lácticas y, más en concreto, la especie *Lactobacillus* fijan el Se intracelularmente como SeCys. En otros casos, LAB puede acumular selenio en forma elemental por la activación del mecanismo de desintoxicación que incluye la reducción de selenio tetravalente al selenio elemental, pudiéndose observar un color rojo en la biomasa (Alzate et al. 2008).

Otro procedimiento para incrementar el nivel de selenio en los alimentos es mediante la biofortificación agronómica de cultivos. El uso de fertilizantes enriquecidos en selenito de sodio es una de las técnicas más comúnmente utilizadas para la obtención de vegetales con alta concentración de Se (Roman et al. 2014). Esta estrategia se ha utilizado en Finlandia desde 1984. En este país, la concentración en el suelo no es especialmente baja pero dadas las características del suelo, la biodisponibilidad de este elemento es muy reducida, siendo la causa de que los niveles

de selenio ingerido sean inferiores a $50 \mu\text{g Se}\cdot\text{día}^{-1}$. La estrategia propuesta por el Ministerio de Agricultura de Finlandia fue enriquecer con selenio (en forma de Na_2SeO_4) los fertilizantes. Éstos comenzaron a ser utilizados en 1985 y produjeron un notable incremento del contenido de este elemento esencial en los alimentos, lo que repercutió en los niveles de selenio en los habitantes (Seppälä *et al.* 2014). El uso de fertilizantes suplementados con Se es un proceso muy eficaz que favorece la acumulación de Se en las plantas, mejorando incluso el desarrollo de la misma; sin embargo, el crecimiento de la planta puede verse reducido por mecanismos de retroalimentación cuando la concentración de Se es demasiado elevada.

Las plantas con elevada capacidad de acumular Se, como el brócoli (Roberge *et al.* 2003), ajo (Mounicou *et al.* 2009), cebolla (Amoako *et al.* 2009), té verde (Hu *et al.* 2008) y champiñones (Liu *et al.* 2011), son particularmente útiles para la aplicación de ésta estrategia de fertilización. Por otra parte, la adición de selenito a piensos para alimentación animal suele repercutir en un incremento de los niveles de Se en leche, carne, huevos y, en general en toda la cadena alimentaria. De esta forma, la ingesta de Se en países como Japón, Australia, Finlandia, y los EE.UU, así como las áreas de Keshan en China se ha visto incrementada significativamente en las últimas décadas por la aplicación de Se en fertilizantes. El empleo de fertilizantes enriquecidos en Se es una práctica eficaz, pero presenta limitaciones debido a la baja biodisponibilidad del selenio en el suelo. Con el fin de paliar estos problemas, una alternativa es la aplicación foliar de los fertilizantes (Xu & Hu 2004, Hart *et al.* 2011).

II. NANOPARTÍCULAS DE SELENIO: “Nueva Especie” de Selenio



Según la Unión Europea (EU, 2011) se define nanomaterial como aquel donde la composición del 50% de sus partículas tiene un diámetro comprendido entre 1-100 nm. El descubrimiento de las propiedades

singulares de las nanopartículas, respecto a partículas de mayor tamaño con la misma composición, está revolucionando el mundo de la ciencia y la tecnología, abriendo camino a aplicaciones hasta ahora impensables.

Debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas presentan diferentes propiedades físico-químicas respecto a los correspondientes materiales “bulk” (de mayor volumen y masa). La mayor reactividad de las NPs está principalmente influenciada por su elevada relación área superficial/volumen, y por la presencia de numerosos defectos superficiales y sitios catalíticamente activos, características que hacen que la reactividad de las NPs sea aproximadamente 1000 veces superior respecto a las micropartículas o materiales “bulk”. Además, esta reactividad puede

modificarse mediante el recubrimiento o la funcionalización de su superficie. Estas modificaciones pueden alterar sus propiedades ópticas (razón por la cual se observan cambios en el color de las nanopartículas), su comportamiento térmico, resistencia material, solubilidad, conductividad y actividad (foto)catalítica.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el selenio es un elemento esencial para los seres vivos, estando su esencialidad relacionada con selenoproteínas y selenoamino ácidos. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios relacionados con el selenio se centraban en dichos compuestos, sin embargo en los últimos años, y con el desarrollo de la nanotecnología, las nanopartículas de selenio elemental (Se^0) han generado un notable interés debido a sus excelentes propiedades biológicas y baja toxicidad (Peng *et al.* 2007, Li *et al.* 2010). Por otra parte, las SeNPs poseen un alto efecto “scavenging” frente a radicales oxidantes, como ha quedado demostrado en distintos estudios *in vitro* (Gao *et al.* 2014). Las interesantes propiedades de las nanopartículas de selenio (SeNPs) ha hecho que durante estos últimos diez años hayan aparecido multitud de trabajos relacionados tanto con su síntesis (Z. Chen *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009; Bai *et al.* 2008) como con sus aplicaciones, fundamentalmente en el campo bio-médico.

II.1. Reactividad de las Nanopartículas de Selenio:

Métodos de síntesis y estabilización de dispersiones

Actualmente existen tres tipos de metodologías diferentes que pueden emplearse para la síntesis de nanopartículas de selenio y que incluyen métodos físicos, químicos y biológicos. Siendo, estos dos últimos los procedimientos más empleados y en los que nos centraremos en la presente memoria.

Síntesis de SeNPs mediante procesos químicos

Los procedimientos químicos de síntesis de SeNPs se basan fundamentalmente en procesos de oxidación-reducción, entre un compuesto de selenio y un agente reductor. Son conocidos como métodos “verdes”, ya que se realizan en condiciones

experimentales que implican reacciones a temperatura ambiente, empleo de medios acuosos y pH neutro. En este método, por lo general, se parte de una sal inorgánica, como es el Na_2SeO_3 , y la reducción a Se^0 se hace mediante la adición de un agente reductor, como el ácido ascórbico (Xia 2007a; Bai *et al.* 2008). Otros agentes reductores empleados para la síntesis de SeNPs incluyen: borohidruro sódico, citrato sódico (Pettibone *et al.* 2013), tiosulfato sódico (Chris Wang & Lin 2005), tripolifosfato sódico (TPP) (Luo *et al.* 2011) y L-cisteína (Li *et al.* 2010).

La **estabilidad de las NPs** constituye un factor muy importante cuando se trata de establecer las propiedades de las mismas. La síntesis de SeNPs requiere el empleo de modificadores que permitan la obtención de dispersiones de SeNPs estables y de un tamaño definido y controlado. La estabilización de las dispersiones, en la mayoría de los casos, se basa en el recubrimiento de la superficie de las NPs que impide la agregación de las mismas. Los compuestos más empleados para modificar la superficie de las SeNPs, evitando así su agregación, son: proteínas como albúmina de suero bovino (BSA) (Dash *et al.* 2011), monosacáridos (glucosa) (Garti *et al.* 2005), oligosacáridos (sucrosa), polisacáridos (chitosan) (Bai *et al.* 2008) y tensioactivos no iónicos (Tritón X-100) (Soleimani *et al.* 2013).

Los sacáridos son capaces de modular la formación de SeNPs en términos de diámetro, tamaño y morfología. Se ha demostrado que esta modificación está estrechamente relacionada con el tamaño y la estructura molecular del sacárido empleado. En este sentido, la estabilización ejercida por los polisacáridos es mayor que la de los oligosacáridos, y ésta a su vez mayor que la de los monosacáridos. Otro motivo por el cual se puede concluir que los polisacáridos son más eficaces en la estabilización de las NPs, reside en la fortaleza de los enlaces por puentes de hidrógeno. Los polisacáridos como el chitosan tienen una conformación espacial con un gran número de grupos hidroxilos orientados para formar una estructura de red, e impedir de esta forma, la agregación de las SeNPs. Ambos polisacáridos son capaces de recubrir las SeNPs originando dispersiones estables durante un largo periodo de tiempo.

Los tensioactivos no iónicos se han empleado para la estabilización de las SeNPs y presentan grandes ventajas en comparación con los polisacáridos (Soleimani *et al.* 2013): mayor hidrofobicidad, emulsiones más estables y menor sensibilidad al pH del medio de síntesis. Sin embargo, estos modificadores son más sensibles a la temperatura (Acosta 2008), por lo que el proceso de síntesis debe realizarse a temperatura controlada. Los tensioactivos no iónicos se adsorben con sus grupos hidrofílicos ó hidrofóbicos orientados hacia la superficie de las NPs. Por lo cual, el proceso de adsorción dependerá del carácter polar o apolar de la NPs: si existen grupos polares en la superficie de la NP capaces de unirse por puentes de hidrógeno a grupos hidrofílicos del tensioactivo, éste orientará dichos grupos hacia el “core” de la NP (Acosta & Bhakta 2009).

Síntesis de SeNPs mediante procesos biológicos

Los procesos de síntesis biológica de NPs se basan en la capacidad que poseen ciertos microorganismos de reducir iones metálicos a su estado metálico (algunas veces en forma de nanopartículas metálicas), y como consecuencia de un mecanismo de destoxificación. Esta capacidad de los microorganismos ha sido explotada para diversas aplicaciones en el campo de la biorremediación, biomineralización, biolixiviación y biocorrosión. En la actualidad, la síntesis microbiana de las nanopartículas se ha convertido en un prometedor campo de investigación. Los sistemas microbianos presentan mecanismos de destoxificación frente a los metales por biomineralización extracelular, bioadsorción, complejación / precipitación o bioacumulación intracelular. Entre los microorganismos empleados en la síntesis biológica de SeNPs se encuentran bacterias como *Stenotrophomonas maltophilia* (Di Gregorio *et al.* 2005), *Lactobacillus Brevis* (Yazdi *et al.* 2013), *Pantoea agglomerans* (Torres *et al.* 2012) y, levaduras como *Saccharomyces Cerevisae* (Zhang *et al.* 2012).

Aunque los métodos biológicos se consideran seguros, rentables, sostenibles y respetuosos con el medio ambiente, también presentan algunos inconvenientes como los largos períodos de síntesis necesarios y el difícil control sobre la distribución del tamaño, forma y cristalinidad de las NPs sintetizadas (Narayanan & Sakthivel 2010).

II.2. Efectos Biológicos de las Nanopartículas de Selenio

II.2.1. Capacidad antioxidante y citotoxicidad

Como se ha comentado anteriormente, las funciones biológicas del Se dependen directamente de la forma química en la que se encuentre este elemento. Los compuestos de Se orgánicos e inorgánicos pueden presentar diferentes propiedades antioxidantes y pro-oxidantes, respectivamente. Si bien existen muchos estudios acerca del carácter quimiopreventivo de especies como la SeMet y SeMetSeCys; sin embargo, no ha sido hasta hace unos años cuando se ha comenzado a investigar el potencial biológico de las SeNPs. En estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* con SeNPs y distintos compuestos químicos de selenio (orgánicos como inorgánicos) se ha puesto de manifiesto la mayor capacidad antioxidante y menor toxicidad de las SeNPs con respecto al resto de formas químicas de selenio.

La toxicidad o actividad pro-oxidante del selenito sódico se asocia con la interacción de selenito con la proteína glutatión para formar compuestos mixtos de selenio y azufre reactivos, que conducen a la producción de radicales tóxicos como superóxido y peróxido de hidrógeno (Zhang & Spallholz 2009; Zhang et al. 2001). Esta capacidad catalítica para la oxidación es de un orden de magnitud mayor en el selenito que en las SeNPs, demostrándose así la mayor toxicidad del primero. Las SeNPs presentan dosis letales en concentraciones siete veces superiores que el selenito (Zhang & Spallholz 2009). En lo que respecta a especies de selenio orgánicas, estudios *in vivo* llevados a cabo mediante la suplementación de selenio en forma de SeMet, SeMetSeCys y SeNPs a animales de experimentación, proporcionaron valores de LD₅₀ de 25.6, 14.6 y 92.1 mgSe·Kg⁻¹, respectivamente. Además de una menor toxicidad, la suplementación con SeNPs eleva los niveles de determinadas enzimas como la alanina aminotransferasa y lactato deshidrogenasa y, selenoenzimas como glutatión S-transferasa (H. Wang et al. 2007; Zhang & Spallholz 2009). A pesar de los daños hepáticos ocasionados por las distintas formas de Se tras una administración de 5 mgSe·Kg⁻¹, dichos cambios parecen ser reversibles y moderados en el caso de la ingesta de SeNPs. Todos esos resultados ponen de manifiesto la eficacia comparable e incluso superior de las SeNPs frente a otras formas de Se para la sobreexpresión de

selenoenzimas y niveles de selenio en tejidos, manteniendo una menor toxicidad (Zhang & Spallholz 2009).

A pesar de que la actividad anticancerígena de las NPs ha sido propuesta en varios estudios (Forootanfar *et al.* 2014; Vekariya *et al.* 2012), el mecanismo a través del cual ejercen esta función todavía no está suficientemente claro. Algunos autores justifican esta capacidad como resultado de la inhibición de la proliferación celular, modulación del estado redox, estimulación del sistema inmune, e inhibición de la angiogénesis (proceso fundamental en el crecimiento tumoral). Sin embargo, de entre todos los mecanismos propuestos, la apoptosis celular (Huang *et al.* 2013) y la activación de las caspasas (enzimas críticas para la inducción de apoptosis) han sido los que han recibido más atención por parte de los investigadores (Lopez-Heras *et al.* 2014; Estevez *et al.* 2014). Por todo ello, uno de los campos de mayor actividad investigadora dentro de la nanotecnología son las aplicaciones biomédicas. Generalmente, las interacciones específicas entre ligando-receptor son una de las estrategias más utilizadas a la hora de diseñar sistemas de liberación de fármacos. En esta línea, se ha demostrado que las NPs pueden dirigirse específicamente y acumularse en células tumorales y cancerígenas tras conseguir su unión con la moléculas diana (Gao *et al.* 2014).

Como se ha comentado anteriormente, algunas formas químicas de selenio se consideran agentes quimiopreventivos para el tratamiento del cáncer, además hay estudios que confirman la mejora en la eficacia y selectividad terapéutica de determinados fármacos anticancerígenos debido a la presencia de selenio. Se ha demostrado que el selenio protege a tejidos sanos de los daños en el ADN causados por la toxicidad con agentes quimioterapéuticos (Rezvanfar *et al.* 2013; Luo *et al.* 2011); siendo el factor limitante para el uso de Se con este fin su biodisponibilidad y toxicidad. Así el efecto preventivo del selenito sódico frente a la toxicidad de Cisplatino se ve limitado por su metabolización a H_2Se que es un compuesto altamente tóxico (Li *et al.* 2012). La administración de SeNPs, una forma de Se con menor toxicidad confirma la eficacia frente a CIS-Pt debido a la inducción de la síntesis de selenoproteínas con menor toxicidad y aceptable biodisponibilidad (Li *et al.* 2011; Peng *et al.* 2007; M. Wang *et al.* 2007).

Por último, una de las últimas tendencias en el empleo biomédico de SeNPs es el empleo de dichas NPs como agente bactericida frente a determinadas cepas bacterianas como *Leishmania major* (Beheshti *et al.* 2013) y *Staphylococcus Aureus* (Shakibaie *et al.* 2014).

II.2.2. Ecotoxicidad y fitotoxicidad

La mayoría de los estudios indican que las SeNPs, una vez vertidas al medio ambiente (aguas), pueden acumularse en los organismos acuáticos de manera directa, mediante exposición en el medio acuático o ingestión, o de manera indirecta, tras la oxidación de Se^0 a Se(IV) . Todos estos motivos hacen que no sólo sea importante evaluar la toxicidad de las SeNPs a nivel celular, sino también determinar los riesgos ecológicos relacionados con su presencia en el medio ambiente.

La mayoría de los ensayos para establecer la ecotoxicidad de las NPs emplean peces e invertebrados, y en el caso de las SeNPs los datos de los que se disponen son escasos. La evaluación del efecto de las SeNPs y SeMet en larvas de mosquito (*Chironomus dilutu*) puso de manifiesto una mayor inhibición del crecimiento de las larvas en presencia de SeNPs. Resultados similares se obtuvieron en estudios de exposición a SeNPs y Se(IV) en peces como el caso del pez Medaka (Conley *et al.* 2014). La exposición a ambas formas de selenio originó un incremento en la concentración de este elemento en diferentes tejidos, sin embargo la capacidad de acumulación de las SeNPs fue mayor en ciertos órganos, como el hígado, mostrando de esta forma una mayor toxicidad e induciendo al estrés oxidativo.

En lo que respecta al efecto de las SeNPs en plantas, los datos son muy escasos, especialmente si se compara con los existentes cuando se suplementa selenio en forma de Se(IV) y Se(VI) . La interacción SeNPs -plantas se ha restringido a enfoques como: acumulación de SeNPs, crecimiento y morfogénesis. Estudios realizados en plantas acumuladoras de Se de la familia *Allium* tras la aplicación foliar de SeNPs, Na_2SeO_3 y Na_2SeO_4 (Golubkina *et al.* 2012); demostraron la baja capacidad de biotransformación de SeNPs a otras formas orgánicas. La justificación de la baja

actividad metabólica y su insignificante absorción por los diferentes componentes de la planta, fue atribuida a la presencia de microorganismos en el suelo que participan activamente en el metabolismo del Se y podían oxidar las SeNPs. En lo que respecta a la acumulación y transformación de NPs en plantas mediante su aplicación foliar, los resultados son contradictorios, ya que estos están condicionados por las particularidades que presenta la epidermis de las hojas (tubos, cutícula, tricomas y estigma), tal y como se pone de manifiesto en diferentes estudios (Ma *et al.* 2014).

En estudios realizados tras la aplicación en el medio hidropónico de cultivo de SeNPs en *Raphanus Sativus* (Palomo-Siguero *et al.* 2014) se puso de manifiesto que las SeNPs se acumulan y posteriormente se transforman a SeMeSeCys, en un metabolismo análogo al observado en presencia de Se(IV). Resultados obtenidos en otros trabajos, en los que se compara el efecto de las SeNPs con el Se(VI) tras ser adicionados al medio de cultivo, demostraron que las SeNPs fueron capaces de aumentar la germinación de las semillas y estimular la organogénesis de varias plantas de interés agronómico (Domokos-Szabolcsy *et al.* 2012). Todos estos estudios ponen de manifiesto que las plantas son capaces de acumular y biotransformar las SeNPs, lo que va a afectar notablemente a su toxicidad.

II.3. Aplicaciones de las Nanopartículas de Selenio

Como se ha comentado anteriormente, una de las aplicaciones más importantes de las NPs es en el campo biomédico con el fin de incrementar la biodisponibilidad de fármacos y agentes terapéuticos, y conducirlos de forma específica para el tratamiento de determinados órganos o células (Sanvicens & Marco 2008; El-Ramady *et al.* 2014). Las SeNPs se han combinado con moléculas de distinta naturaleza para distintas finalidades moleculares y biológicas. Así las SeNPs se han funcionalizado con ácido fólico (Pi *et al.* 2013) y 5-fluorourácilo (Liu *et al.* 2012) para el tratamiento de cáncer de mama y melanoma, respectivamente. Las SeNPs se acumulan en las células objeto de tratamiento mediante un mecanismo de endocitosis y posteriormente se induce la apoptosis celular mediada por las caspasas. En otro

trabajo (Zhang *et al.* 2013), se seleccionó la molécula adenosina trifosfato (ATP) para la funcionalización de las SeNPs. Una de las razones de emplear este compuesto es que se encuentra en la mayoría de las células eucariotas. De este modo, las SeNPs atraviesan fácilmente la membrana celular y por consiguiente se mejora su actividad anticarcinogénica como se demostró por la inducción de apoptosis en células de hepatocarcinoma humano HepG2.

La nanotecnología también ha tenido aplicación dentro del campo de la alimentación. La nanotecnología puede emplearse, por ejemplo, para mejorar el sabor y la textura de los alimentos y encapsular ciertos nutrientes como vitaminas para impedir que se degraden durante la vida útil del producto. Asimismo, se pueden emplear nanomateriales para fabricar envases que conserven mejor y por más tiempo la integridad del producto. Aun más, pueden crearse envases inteligentes dotados de nanosensores que informen al consumidor del estado en que se encuentra el producto del interior, por tanto se trataría de un empaquetado inteligente que literalmente pueda oler, detectar y destruir microorganismos que puedan hacer que el alimento se malogre o adquiera mal sabor (Cushen *et al.* 2012; Chen *et al.* 2014).

Las nanopartículas pueden estar presentes en los alimentos por migración desde el envase (Echegoyen & Nerín 2013; Ramos *et al.* 2014; Artiaga *et al.* 2015) o adicionadas intencionadamente como aditivo alimentario. En este sentido, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria publicó una Guía de Orientación para evaluar los riesgos de las aplicaciones de la nanociencia y de las nanotecnologías en los alimentos y en la cadena alimentaria (EFSA Journal, 2011).

Los nanomateriales metálicos y de óxidos metálicos son muy empleados en el sector alimentario y dentro de ellos cabe destacar los de plata, oro, óxido de zinc, sílice, óxido de titanio, alúmina y óxidos de hierro. Dentro de la aplicación de la nanotecnología a la industria alimentaria, el desarrollo de envases es una de las áreas más activa. En esta línea, se han desarrollado nanocomposites poliméricos que incorporan nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos para envases activos antimicrobianos, con resistencia a la abrasión y/o que absorben los rayos ultravioletas. Debido a su actividad antimicrobiana, las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido uno

de los materiales más empleados en la industria alimentaria. Se han desarrollado una gran cantidad de envases activos basados en la actividad antimicrobiana de la nanoplata, que indican que preservan los alimentos durante más tiempo inhibiendo el crecimiento de microorganismos. Algunos ejemplos de estos envases que ya se encuentran en el mercado son “FresherLonger™ Miracle Food Storage Containers” y “FresherLonger™ Plastic Storage Bags” de Sharper Image® USA, “Nano Silver Food Containers” de A-DO Korea, y “Nano Silver Baby Milk Bottle” de Baby Dream® Co. Ltd. (Corea del Sur). Otros envases aprovechan la capacidad de los óxidos de zinc y óxidos de titanio como bloqueante de la radiación ultravioleta. Taiwan ha introducido en el Mercado su Nano Plastic Wrap que contiene un catalizador de luz basado en nano óxido de cinc que es capaz de esterilizar con luz no directa. Como queda demostrado el mercado ha incorporado ya materiales con nanopartículas (principalmente en Estados Unidos y Asia). En Europa el uso de materiales con nanopartículas en contacto directo con los alimentos no está permitido. Únicamente el nitruro de titanio en forma de nanopartícula aparece en la lista positiva del Reglamento 10/2011/EU.

En lo que respecta a nanopartículas empleadas como aditivos, tanto el TiO_2 (E171) como el SiO_2 son aditivos alimentarios (E551) autorizados por la UE. El primero se emplea como blanqueante de ciertos alimentos tales como productos lácteos y caramelos y, para potenciar el aroma de productos como vegetales secos, y bebidas como el vino y la cerveza. El segundo se emplea habitualmente para facilitar el movimiento de alimentos sólidos en máquinas. La amplia aplicabilidad de ambos justifica establecer la exposición de estos aditivos en su forma nano.

A diferencia de lo que ocurre en el sector de la cosmética donde la presencia de nanopartículas debe aparecer en el etiquetado del producto, no ocurre igual en el sector de la alimentación. No cabe duda que la regulación legislativa de los niveles de nanopartículas en alimentos requiere disponer de metodologías analíticas lo suficiente robustas y fiables que permitan detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas.

I. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO Y SUS ESPECIES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

La determinación del contenido total de los elementos traza, aunque importante, no ofrece suficiente información acerca de su posible función biológica, efectos beneficiosos, toxicidad o comportamiento en el medio ambiente. Por ello, es necesario conocer la forma química en la que se encuentra el elemento de interés. Una vez incorporados en el organismo, los elementos traza, sufren transformaciones químicas que pueden llegar a alterar sus propiedades, por lo que la determinación de las diferentes especies en la ruta metabólica es esencial para comprender mejor los mecanismos de absorción celular, transporte, almacenamiento o excreción (B'Hymer & Caruso 2006). La especiación de selenio, por lo general, implica un tratamiento de la muestra (extracción, derivatización y/o preconcentración), separación de especies y posterior identificación y cuantificación. Todas estas etapas conllevan errores intrínsecos que pueden afectar a la exactitud y veracidad de los resultados.

I.1. Tratamiento de la Muestra

El selenio en muestras biológicas se encuentra en muy bajas concentraciones, por lo que es necesario disponer de técnicas de alta sensibilidad para llevar a cabo su determinación. La mayoría de estas técnicas requieren un tratamiento previo de la muestra, que va a depender de varios factores: del nivel de concentración, estado físico de la muestra y de si el objetivo final es la determinación de la concentración total o las especies del elemento. En los estudios de especiación, el proceso de tratamiento de muestra es crucial; hasta el punto que los resultados finales dependerán en gran medida del proceso de extracción utilizado.

La Figura 5 ilustra las diferentes etapas llevadas a cabo en un estudio de determinación de selenio y sus especies.

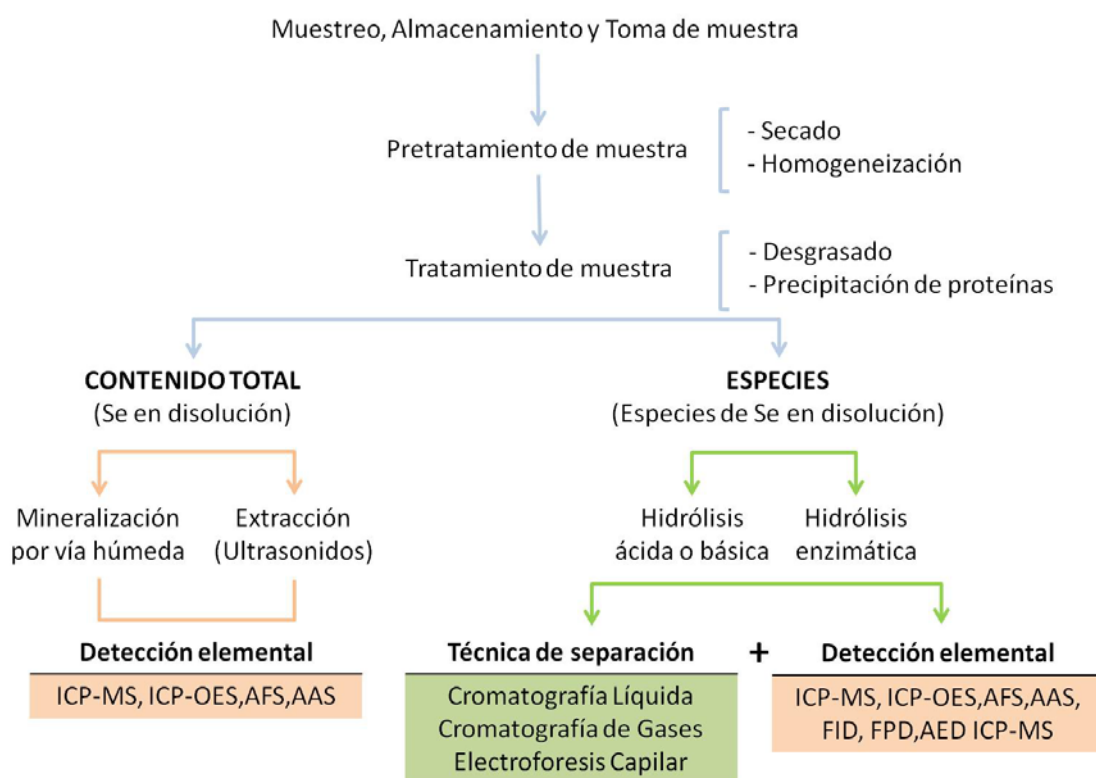


Figura 5. Etapas para la determinación de Se total y sus especies

I.1.1. Determinación del contenido total de selenio

Para la determinación de contenido total, la mayor parte de las técnicas instrumentales pasan por convertir los analitos de interés a una forma química que permanezca estable en disolución. En la mayoría de las ocasiones, este proceso requiere de la destrucción de la matriz orgánica de la muestra mediante procesos llamados de digestión o mineralización. Actualmente, el tratamiento de muestra más empleado para la determinación de la concentración de selenio en muestras complejas es la mineralización por vía húmeda asistida por radiación de microondas. Para ello, las muestras se colocan en reactores de teflón capaces de soportar elevadas temperaturas y presiones y, en general, el tratamiento de la muestra se lleva a cabo con HNO_3 ó con mezclas de éste con H_2O_2 (Palomo *et al.* 2014).

I.1.2. Extracción de especies de selenio

La dificultad en el tratamiento de muestra aumenta cuando se requiere determinar la concentración de las especies. Los métodos de tratamiento de la muestra en estudios de especiación, deben cumplir varios requisitos, entre ellos: incluir el menor número de pasos posibles para evitar contaminación y pérdidas, conseguir altas recuperaciones y además mantener la integridad de las especies químicas de los analitos a determinar. Para la extracción de las especies de selenio se han empleado diversos procedimientos (Yang *et al.* 2004, Viñas *et al.* 2005). Estos se pueden resumir en: 1) hidrólisis ácida- empleando HCl , 2) hidrólisis básica con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), y 3) hidrólisis enzimática empleando enzimas como proteasas.

El selenio se encuentra en la mayoría de las muestras biológicas en forma de selenoamino ácidos, por dicha razón el método más utilizado para la extracción de especies de selenio es la **hidrólisis enzimática**. La cual emplea condiciones de pH y temperatura moderadas (B'Hymer & Caruso 2006), preservando la integridad de las especies.

Las proteasas, enzimas no específicas, son las más utilizadas en este tipo de tratamiento de muestra, entre ellas la Proteinasa K (Montes-Bayón *et al.* 2002), Pepsina (Pedrero & Madrid 2009), Subtilisina (Cuderman & Stibilj 2009), y la Pronasa E (Seppälä *et al.* 2014)(Proteasa tipo XIV aislada de *Streptomyces griseus*), siendo esta última la más empleada. Dependiendo del tipo de matriz, en muchas ocasiones es necesaria la utilización de otras enzimas (combinadas con las proteasas) como lipasas (recomendadas para muestras con alto contenido lipídico) (Hart *et al.* 2011), amilasas (utilizada en la hidrólisis de glucógeno y almidón) (Cubadda *et al.* 2010) y lisozima (encargada de romper paredes bacterianas) (Zhang *et al.* 2009)).

Algunos aminoácidos de selenio no se encuentran incorporados a proteínas, son los denominados aminoácidos no proteogénicos. En estos casos, la eficiencia de extracción es independiente del empleo o no de proteasas. A este grupo de compuestos corresponden la SeMeSeCys y γ -glutamyl-selenometilselenocisteína. En la Tabla 4 se recogen varios ejemplos de tratamientos de diferentes muestras de origen biológico empleando enzimas para la extracción de especies de Se.

Tabla 4. Tratamientos enzimáticos para la extracción de Se-especies

Muestra	Especies Identificadas	Tratamiento enzimático
Nueces de Brasil	SeMet	Proteinasa K en Buffer Tris-HCl. Agitación 20h / 37 °C / oscuridad
Músculo, corazón, riñón e hígado de cordero	SeMet / SeCys	Proteasa + Lipasa en buffer Tris-Cl y Urea. Incubación 20h / 37 °C
Levaduras	SeMet	Proteasa XIV en buffer Tris-Cl Incubación 20h / 37 °C
Plantas (<i>Brassica juncea</i>)	SeMet y especies no identificadas	Proteinasa K en H ₂ O Incubación 20h / 37 °C
Suplementos dietéticos	Se-MeSeCys	Proteasa XIV en H ₂ O Agitar 24h / t.a.
Vegetal (<i>Raphanus Sativus</i>)	Se(VI), SeMet, SeCys ₂ , SeMeSeCys	Proteasa XIV en H ₂ O y HCl Sonda focalizada 3 min
Productos lácteos	SeCys ₂ , SeMet, Se(IV)	Proteasa + Lipasa en buffer Tris-Cl y Urea. Sonda focalizada 2 min

Pan	SeMet	Proteasa XIV en buffer Tris-Cl Microondas /Sonda focalizada/ Incubación
-----	-------	--

A pesar de las ventajas de la hidrólisis enzimática para la extracción de especies de selenio, el procedimiento es largo y tedioso ya que implica largos periodos de incubación (37 °C durante un tiempo entre 24 y 48 horas (Unrine et al. 2007)).

La aplicación de la energía de ultrasonidos, empleando fundamentalmente sonda de ultrasonidos, ha supuesto una reducción considerable de los tiempos de tratamiento, alcanzándose la extracción cuantitativa de las especies de selenio en tiempos que oscilan entre 15 segundos y 3 minutos. La ventaja de poder reducir considerablemente el tiempo de análisis, va acompañada de la desventaja de que la energía de ultrasonidos es más agresiva para las muestras, lo que supone un riesgo para la transformación de las especies presentes en la matriz. La sonda de ultrasonidos se ha empleado para la extracción de distintas especies de Se (Se(IV), Se(VI), SeMet, SeMeSeCys y SeCys₂) en distintas matrices biológicas: pescado (Caruso & Montes-Bayon 2003), yogurt (Palomo *et al.* 2014; Alzate *et al.* 2007), pan (Sánchez-Martínez *et al.* 2015) y muestras vegetales (Cubadda *et al.* 2010).

I.2. Separación e Identificación de Especies de Selenio

I.2.1. Técnicas hifenadas: métodos cromatográficos con acoplamiento a la espectrometría de masas

Una vez realizada la extracción de las especies de selenio, es necesaria su identificación. Desafortunadamente las técnicas habituales para la determinación de elementos traza responden a la concentración total del elemento, no son selectivas a las especies. Por lo tanto, la especiación por lo general, requiere del acoplamiento de dos técnicas: una técnica para separar formas químicas del elemento de interés y un método de detección sensible y específico que proporcione la detección de la sustancia analizada a bajos niveles de concentración (Caruso & Montes-Bayon 2003).

Las técnicas de separación más empleadas son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) (Yang *et al.* 2004). La GC es la más adecuada para analizar especies volátiles o volatilizables de selenio, es necesario un paso de derivatización previo, lo que conlleva un tratamiento más tedioso que además puede provocar la descomposición térmica de algunas especies (Yang *et al.* 2004). La técnica de HPLC es la más empleada para la separación de especies de selenio, debido a que la mayoría de ellas no son volátiles, y por otra parte a la versatilidad de la técnica en lo que respecta a mecanismos de separación. La separación de compuestos de selenio se ha realizado empleado mecanismos de intercambio iónico (empleando fases móviles como disoluciones tampón de fosfato (Bird *et al.* 1997), citrato (Unrine *et al.* 2007) y formiato (Cubadda *et al.* 2010)); fase inversa (empleando modificadores de pares de iones para mejorar la separación como el ácido trifluoroacético (TFA) (Gammelgaard *et al.* 2002) y ácido heptafluorobutírico (HFBA) (Amoako *et al.* 2009)) y exclusión molecular (para la separación de selenio unido a biomoléculas).

Una vez separados los compuestos estos son detectados “en línea” y en tiempo real mediante el acoplamiento de la salida de la columna cromatográfica a detectores sensibles y específicos, entre las que destacan la absorción atómica (AAS), fluorescencia atómica (AFS), la espectrometría de masas (MS) y el plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS) o con detección óptica (ICP- OES). Aunque las combinaciones que se han ensayado y publicado han sido muy diversas, el acoplamiento más fructífero para especiación de selenio es la cromatografía de líquidos (HPLC) acoplada al ICP-MS. En la Tabla 5 se resumen las características que ofrece el ICP-MS como detector para especiación de selenio.

Tabla 5. Ventajas-Inconvenientes del ICP-MS como detector en especiación

Ventajas	Inconvenientes
- Permite obtener información elemental (de metales, semimetales y algunos no-metales como S, P...).	- La información molecular se destruye completamente (debido a la energía de la fuente).
- Proporciona información isotópica.	- La detección de elementos como el C, N u O se encuentra completamente imposibilitada debido a los elevados fondos espectrales ya que el plasma se genera en una atmósfera abierta.
- La intensidad depende de la masa y no de la concentración.	- No tolera grandes concentraciones de disolventes orgánicos empleados en ciertas cromatografías (p. ej. Metanol, acetonitrilo).
- Permite la cuantificación. precisa y exacta del metal	
- Permite el acoplamiento de HPLC, CE, GC...	

Uno de los problemas de la determinación de selenio mediante ICP-MS es la presencia de interferencias espectrales que hacen que su monitorización a veces sea problemática (Tirez *et al.* 2000). La mayor interferencia es la formación del dímero $^{80}\text{Ar}^{2+}$ que solapa con la señal del isótopo más abundante de Se, ^{80}Se . Otros isótopos menos abundantes de Se, pero que poseen menos interferencias espectrales son: ^{82}Se , ^{78}Se o ^{77}Se . El isótopo ^{82}Se es el más empleado en la determinación de Se pues a pesar de tener una abundancia relativamente baja (8,7%) es el menos afectado por interferencias espectrales. En la Tabla 6 se muestran las principales interferencias para cada isótopo de Se.

Tabla 6. Interferencias para los distintos isótopos de Se en la técnica ICP-MS

Isótopo	Abundancia (%)	Interferencias
^{74}Se	0.89	$^{37}\text{Cl}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$, $^{74}\text{Ge}^+$, $^{38}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$
^{76}Se	9.37	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{76}\text{Ge}^+$, $^{39}\text{K}^{37}\text{Cl}^+$
^{77}Se	7.63	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{ArH}^+$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{41}\text{K}^{36}\text{Ar}^+$, $^{42}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$
^{78}Se	23.77	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{78}\text{Kr}^+$, $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$, $^{64}\text{Zn}^{14}\text{N}^+$, $^{44}\text{Ca}^{34}\text{S}^+$
^{80}Se	49.61	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{79}\text{BrH}^+$, $^{80}\text{Kr}^+$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$
^{82}Se	8.73	$^{81}\text{BrH}^+$, $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}^+$, $^{82}\text{Kr}^+$

Una forma efectiva de eliminar las interferencias espectrales es el uso de instrumentos de alta resolución. Sin embargo, un aumento en la resolución implica una disminución de la sensibilidad y un incremento en los límites de detección. En la actualidad los instrumentos de ICP-MS equipados con celdas de reacción y/o colisión son muy empleados, siendo la mejor alternativa a los sistemas de alta resolución sin sacrificar la sensibilidad. Mediante la reacción y/o colisión de los iones poliatómicos interferentes con el gas apropiado, (entre los más utilizados se encuentran el H_2 , He y O_2), se consigue eliminar estas interferencias (Z. Chen *et al.* 2008). En el caso del selenio, el empleo de hidrógeno y helio es especialmente útil ya que permite la monitorización del isótopo más abundante (^{80}Se , abundancia 49,61%) de este elemento, el cual se encuentra interferido principalmente por iones poliatómicos del tipo $^{40}\text{Ar}_2^+$. Como consecuencia, el límite de detección disminuye notablemente.

Uno de los problemas de la especiación es la identificación de las especies. La forma más habitual es mediante la comparación de los tiempos de retención con patrones de especies de selenio. Desafortunadamente, no existen patrones disponibles comercialmente para todas las especies de selenio, y por otra parte, pueden co-eluir varias especies, originando errores en la asignación de estructuras. Por lo tanto, una correcta identificación de las especies implica el empleo de al menos dos técnicas de separación con mecanismos diferentes, y especialmente el empleo de técnicas de espectrometría de masas.

I.2.2. Técnicas de espectrometría de masas para la identificación de especies de selenio

Cuando lo que se busca es obtener información estructural deben utilizarse técnicas de ionización suave como la espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) o la espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS). Los selenocompuestos no pueden ser directamente analizados por ESI-MS por la presencia de sales en la matriz, que pueden originar un efecto supresor en la correcta ionización del selenio. La identificación de

estas especies de Se en matrices biológicas, normalmente, está basado en la purificación de los compuestos de interés mediante cromatografía multidimensional y posterior aplicación de la espectrometría de masas.

La técnica de MALDI es menos vulnerable que ESI-MS a efectos supresores ocasionados por la matriz y produce, principalmente, iones cargados individuales. Estas características la hacen una técnica interesante para la identificación de iones determinados, que de otra manera permanecerían sin identificar con ESI-MS (Reyes *et al.* 2006).

Aunque se están realizando grandes avances, la mayoría de las aplicaciones se han limitado a muestras con elevado contenido en selenio, como levaduras selenizadas (Bierla *et al.* 2013b; Rao *et al.* 2010). Sin embargo, la identificación de especies a bajas concentraciones requiere una compleja metodología que incluye laboriosas etapas de limpieza y preconcentración de la muestra. Las atractivas características del acoplamiento nanoLC-ESI-MS en términos de bajo consumo de muestra, así como de una alta tolerancia relativa hacia la presencia de niveles elevados de sales o tampones pueden ayudar a mejorar los límites de detección (Peachey *et al.* 2009; Pedrero & Madrid 2009). En los últimos años, la introducción de analizadores de masas como el Orbitrap, que permiten alcanzar límites de detección del orden de partes por billón, ha supuesto un impulso importante para que técnicas como el ESI-Orbitrap/MS/MS se incorporen al campo de la especiación y metalómica (Bianga *et al.* 2013; Galano *et al.* 2013). Desafortunadamente, es una técnica costosa, no asequible para la mayoría de los laboratorios.

I.2.3. Problemática y validación de los resultados en la especiación de selenio

La validación de los resultados requiere del empleo de al menos dos metodologías analíticas independientes, el uso de materiales de referencia certificados (CRM) y la realización de estudios de intercomparación (Valcarcel & Ríos 1992). Sin embargo, dicha validación es una tarea difícil debido a la escasez de materiales de referencia certificados para especies y diferentes matrices, ya que para que la

validación sea correcta es necesario que la matriz del material de referencia sea idéntica o muy similar a la de la muestra, y la concentración de las especies sea del mismo orden (Zeleny & Schimmel 2012). En los últimos años, se han preparado algunos CRM como levadura selenizada y harina selenizada certificados en el contenido en selenio total y SeMet.

Con el objetivo de superar los inconvenientes derivados de la falta de materiales de referencia y de los métodos clásicos de calibración, la técnica de análisis por dilución isotópica (IDA, Isotopic Dilution Analysis) se considera como una estrategia muy útil para la determinación de metales en diferentes matrices (B'Hymer & Caruso 2006). La dilución isotópica está basada en la medida de la relación isotópica de un elemento en una muestra, en la que su composición isotópica se ha alterado mediante la adición controlada de una cantidad conocida de ese elemento enriquecido isotópicamente (conocido como trazador o spike). La principal ventaja que presenta el IDA es la independencia respecto a posibles variaciones en la sensibilidad del equipo y a los efectos de la matriz (Rappel & Schaumlöffel 2008). Entre los diferentes métodos de IDA, los más empleados son: “species-unspecific” (también conocido como IDA inespecífica o post-columna) (Lopez Heras *et al.* 2011b) y “species-specific” (IDA específica) (Reyes *et al.* 2006). En el primer caso, el trazador puede encontrarse en una forma química diferente a la de la especie de interés, permitiendo así cuantificar especies de estructuras desconocidas o de las que no se disponen patrones comerciales isotópicamente marcados. Por el contrario, la ID específica requiere que se conozca previamente la forma química del elemento, ya que el trazador debe estar marcado isotópicamente en la misma forma (Sánchez-Martínez *et al.* 2015).

A pesar de las ventajas del uso de la dilución isotópica para minimizar el efecto de la transformación de especies, esta técnica posee un uso bastante restringido por la falta de especies de selenio enriquecidas isotópicamente que se encuentren disponibles comercialmente.

II. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE NANOPARTÍCULAS

A pesar de que cada vez son más numerosos los productos que contienen nanopartículas, la información acerca de su incidencia, destino y toxicidad es escasa. Legislar estas sustancias requiere disponer de metodologías analíticas lo suficiente robustas y fiables que permitan detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas (Linsinger *et al.*, 2013). La caracterización de las nanopartículas implica no solo establecer su identidad química sino también el tamaño, ya que sus propiedades dependen del mismo. Uno de los objetivos más importantes del análisis de nanopartículas es la obtención de preparaciones estables. Los protocolos de extracción y tratamiento de muestra conllevan, en la mayoría de los casos, alteraciones de las propiedades físico-químicas de las mismas. Los agentes estabilizantes empleados en el proceso de síntesis o los recubrimientos pueden perder su funcionalidad durante la etapa de tratamiento de muestra. Procesos de dilución, variaciones de pH, disolventes empleados en separaciones cromatográficas pueden causar agregación de las

nanopartículas, modificando sus propiedades primarias y originando una información errónea sobre la distribución de tamaños.

A continuación se tratarán más en detalle los aspectos indicados anteriormente.

La preparación de dispersiones estables es probablemente uno de los objetivos más importantes tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo de las NPs. Los factores que afectan a la estabilidad de las NPs son su tamaño, carga y naturaleza del recubrimiento. Cuando una NP se encuentra estabilizada, se crea alrededor de cada una de ellas una fuerza repulsiva estérica o doble capa eléctrica, donde los factores más influyentes son el espesor de la misma y el potencial zeta, estando la **fuerza iónica (FI)** directamente relacionada con la doble capa (por lo cual un aumento en la FI, implica un aumento en el tamaño hidrodinámico) e inversamente con el potencial zeta. De hecho se ha observado como NPs estables de TiO_2 en disolución 0.001 M de NaCl con un tamaño de 90 nm, al cambiar de medio a 0.005 M de NaCl el tamaño de partícula se modifica a 145 nm dando lugar a dispersiones inestables y aglomeradas (Jiang et al. 2009) y, un potencial zeta menor.

La carga superficial de la dispersión (potencial zeta) y consecuentemente el tamaño hidrodinámico puede verse alterado por cambios en **el pH** de la disolución. Cuando el pH de la disolución está lejos del punto isoeléctrico, el valor absoluto del potencial zeta aumenta, las fuerzas electrostáticas repulsivas o doble capa son predominantes a las fuerzas atractivas de Van der Waals y tanto el tamaño como la aglomeración disminuyen (Palomo-Siguero *et al.* 2014).

El criterio general para preparar dispersiones estables es aumentar las fuerzas de repulsión entre las partículas, de tal manera que la aglomeración se suprime o es cinéticamente lenta. La carga superficial se puede controlar por el **uso de sales como agentes de dispersión**, pudiendo emplearse cualquiera que contenga polifosfato, hexametáfosfato, pirofosfato y aniones polisilicatos (Stroyuk *et al.* 2008; Sinha *et al.* 2004). Desafortunadamente, la estabilización electrostática es solo eficiente cuando la FI es menor de 0.1 M. Sin embargo, la estabilización estérica por **estabilización de NPs con polímeros** resulta eficaz para todos los valores de FI. Los polímeros más empleados para la estabilización de NPs son: chitosan (Dash *et al.* 2011), sacarosa

(Rezvanfar *et al.* 2013), polietilenglicol (Wiecinski *et al.* 2009) ó surfactantes etoxilados (Chris Wang & Lin 2005) y la albúmina (Ren *et al.* 2013; Forootanfar *et al.* 2014).

A veces, las NPs se encuentran tan agregadas que es necesario recurrir a **métodos de dispersión por ultrasonicación**, para formar cavidades. La efectividad del procedimiento depende del volumen de dispersión y del tiempo de sonicación y potencia aplicada, siendo el baño de ultrasonidos y la sonda focalizada los métodos más comunes (Priego-Capote & Luque De Castro 2004). Bajo condiciones controladas la sonda ofrece mejores resultados, sin embargo, la aplicación de largos tiempos de sonicación puede promover la agregación debido al aumento de las interacciones partícula-partícula (Jiang *et al.* 2009). En el caso particular de las SeNPs, éstas poseen por lo general una morfología esférica en estado de no agregación, por lo que no se requiere el empleo de métodos de sonicación agresivos o durante largos tiempos.

II.1. Análisis Cualitativo:

Caracterización y Detección de Nanopartículas de Selenio

Existen varias técnicas para detectar, medir y caracterizar las nanopartículas. No hay un método que se puede seleccionar como el “mejor” o “único”. Unas técnicas pueden simplemente detectar la presencia de nanopartículas, mientras que otras pueden dar la cantidad, la distribución del tamaño o el área de superficie de las nanopartículas, siendo necesaria una combinación de muchas de ellas para una correcta caracterización de las dispersiones de NPs. Hay veces que las NPs pueden agregarse, perder su recubrimiento o transformarse durante el proceso de medida o durante el tratamiento previo a la medida. Las técnicas analíticas involucradas en la caracterización de nanopartículas son variadas (Linsinger *et al.* 2013) e incluyen: **técnicas de microscopia electrónica** de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) y de transmisión (TEM Transmission Electron microscopy); **técnicas basadas en la dispersión de luz**, siendo las más comunes la dispersión de luz dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering) y dispersión multiángulo de luz láser (MALLS, multi-angle laser light

scattering) y **técnicas de fraccionamiento** (filtración, centrifugación, separaciones cromatográficas (exclusión por tamaños) y fraccionamiento de campo de flujo (FFF, Field Flow Fractionation).

II.1.1. Técnicas de Microscopía Electrónica

Las técnicas de microscopía electrónica (EM), basadas en la aplicación de un haz de electrones, poseen una elevada resolución, lo que las convierte en las más aplicadas para la visualización y caracterización de NPs, proporcionando información sobre su tamaño y forma (Chao *et al.* 2012). La obtención de resultados representativos requiere la observación de un elevado número de NPs, lo que las convierte en técnicas muy laboriosas, requiriendo largos tiempos de análisis. Las técnicas más destacables dentro de este campo son la microscopía de transmisión electrónica (TEM) y la microscopía electrónica de barrido (SEM).

Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Cuando un haz de electrones interactúa con una muestra, estos pueden ser transmitidos, dispersados, y difractados. La técnica TEM emplea los electrones transmitidos por la muestra para formar una proyección bidimensional que dependerá del espesor de la muestra (Ye *et al.* 2014). El análisis de las imágenes obtenidas por TEM proporcionan no sólo información sobre el tamaño de la NPs, sino sobre su morfología y estado agregación (Forootanfar *et al.* 2014). En el caso de emplear equipos de elevada resolución se puede incluso visualizar las capas de átomos de muestras cristalinas. Esta técnica requiere la muestra en estado sólido y seca, y con un espesor de varios cientos de nm, por lo que el principal inconveniente es conseguir una muestra que se adecúe a esos requerimientos. En el caso de disoluciones, la evaporación del disolvente puede originar la agregación de las nanopartículas y modificaciones de su superficie (Palomo-Siguero *et al.* 2014). En el caso de muestras de tejidos biológicos, y con el fin de preservar su estado original y mejorar el contraste, a menudo se emplea fijación química. Para ello, las muestras son embebidas en resina y se cortan en secciones delgadas para permitir que el haz de electrones pase a través

de ellas, siendo necesario un largo protocolo para el tratamiento de muestra (Lopez-Heras *et al.* 2014).

A pesar de su gran aplicabilidad en la caracterización de NPs ya que proporciona elevadas resoluciones, en algunos casos inferior a 1 nm, el tratamiento de muestra y la propia irradiación del haz de electrones pueden alterar la morfología y características de las NPs (Herrera & Sakulchaicharoen 2009).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En SEM, el haz de electrones interactúa con la superficie de la muestra y se detectan los electrones dispersados, obteniéndose una imagen en 3D (Herrera & Sakulchaicharoen 2009). Aunque las muestras en SEM no necesitan ser tan delgadas como en TEM, la muestra o al menos su superficie, debe estar recubierta por una capa de material conductor (Zhang *et al.* 2012). En realidad la técnica SEM ofrece menos prestaciones que el TEM para la caracterización de NPs. El principal problema radica en que a veces no es posible diferenciar claramente las nanopartículas del sustrato. El problema puede ser aún más acusado cuando las NPs bajo estudio tienen tendencia a adherirse fuertemente entre sí, formando aglomerados. Sin embargo, SEM proporciona información valiosa con respecto a la pureza de una muestra de nanopartículas, así como una visión sobre su grado de agregación. La gran desventaja tanto del SEM como del TEM en este contexto, es la incertidumbre por si la imagen observada es verdaderamente representativa de la muestra.

Por lo general las técnicas TEM y SEM se combinan con la **espectroscopia dispersiva de energía de rayos X (EDS ó XEDS)**, técnica que permite establecer la composición elemental de las NPs objeto de estudio.

A pesar de las ventajas que ofrece la microscopía electrónica, ésta es una técnica destructiva, lo que significa que la muestra no puede ser examinada varias veces o analizada *a posteriori* por otros métodos de validación. Herramientas alternativas como la **microscopía de rayos X (XRM, X-ray Microscopy)**, permiten el análisis de disoluciones sin la necesidad de una preparación previa y obteniéndose una buena resolución espacial (por debajo de los 30 nm). Esta técnica proporciona

información sobre cristalinidad, tamaño del cristal, orientación y composición de fases (Battin & Brumaghim 2009b; Joshi *et al.* 2008).

La visualización de NPs en disolución también puede llevarse a cabo mediante el empleo de la **microscopía de fuerza atómica** (AFM, Atomic Force Microscopy) (Xia 2007b). Con esta técnica se pueden obtener perfiles superficiales en 3D con una resolución de aproximadamente de 0.5 nm (Joshi *et al.* 2008). A pesar de las ventajas que supone operar a presión atmosférica y poder analizar las NPs en disolución, se plantean algunas cuestiones. La primera es la falta de conocimiento sobre si la visualización en medios acuosos proporciona mejores resultados que los instrumentos que operan a vacío. En un primer momento, el poder analizar la muestra en su estado natural simula las mejores condiciones experimentales. Sin embargo, la humedad atmosférica puede por un lado, favorecer las uniones entre moléculas de agua y NPs; y por otro lado, las puntas de los instrumentos de AFM pueden recubrirse de materia orgánica, afectando de este modo a la veracidad de las imágenes (Montoro Bustos *et al.* 2013).

II.1.2. Técnicas basadas en la dispersión de luz

Las técnicas basadas en la dispersión de luz son la dispersión de luz dinámica (DLS, dynamic light scattering), dispersión de la luz electroforética (ELS, electrophoretic light scattering) y dispersión multiángulo de luz láser (MALLS, multi-angle laser light scattering). Todas estas técnicas se emplean para la medida de parámetros de especial relevancia en la caracterización de NPs, como son el potencial zeta y el diámetro hidrodinámico.

Dispersión de luz dinámica (DLS). Tamaño hidrodinámico

La técnica DLS es una metodología no invasiva y bien establecida para la medida de la distribución del tamaño hidrodinámico de las NPs, con resoluciones por debajo de 1 nm (Cho *et al.* 2013). Cuando en un medio líquido se mueve una partícula dispersa, la mayoría de veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. Debido a que

esta capa influye en el movimiento de la partícula, en DLS el diámetro medido de la partícula, que se conoce como hidrodinámico, la mayoría de veces es superior al diámetro que se mide con un microscopio electrónico de transmisión (TEM). El grosor de la capa depende de distintos factores, entre los cuales cuenta la conductividad del líquido. Las limitaciones que presenta la técnica es que las NPs deben estar en suspensión y bajo movimiento Browniano; además, las partículas con gran tamaño tienen un efecto muy elevado en la dispersión de la luz, enmascarando el originado por otras más pequeñas. La técnica DLS es la técnica más aplicada para la medida de la distribución del tamaño hidrodinámico (Adams *et al.* 2006; Hagendorfer *et al.* 2012; Wiecinski *et al.* 2009).

Dispersión de la luz electroforética (ELS). Potencial zeta

La técnica ELS se emplea para medir el potencial zeta calculado a partir de la movilidad electroforética por medio de la ecuación de Smoluchowski. El potencial Zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Su medida proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de dispersión electrostático. El potencial Zeta es de gran utilidad para la selección de los agentes más adecuados para estabilizar la dispersión de las NPs. s (Cho *et al.* 2013; Jiang *et al.* 2009).

Dispersión multiángulo de luz láser (MALLS). Masas moleculares

Los sistemas de detección basados en MALLS son métodos absolutos para la determinación de masas molares y constituyen una herramienta muy útil en la caracterización de nanomateriales (Ulrich *et al.* 2012). Un método absoluto para determinar masas moleculares es aquel que no requiere el empleo de una calibración previa con sustancias de tamaño conocido (Hagendorfer *et al.* 2012). La técnica requiere una separación previa de las especies a analizar (Runyon *et al.* 2013), si existe una mezcla de moléculas, el resultado será el promedio de la masa molecular de las especies presentes.

En la figura 6, se comparan las principales técnicas empleadas en el análisis de caracterización morfológica referido a tamaño para NPs.

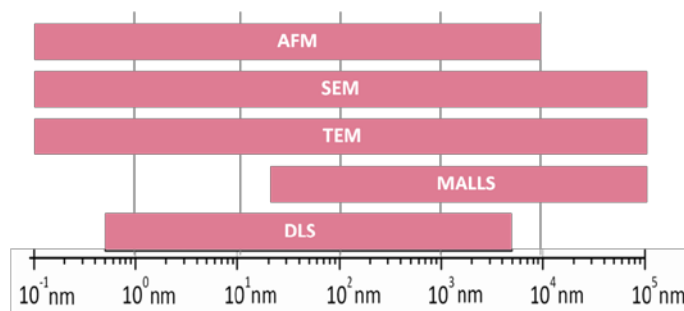


Figura 6. Técnicas disponibles para la caracterización de NPs según su tamaño

II.2. Análisis Cuantitativo

II.2.1. Métodos de separación

Los métodos de separación permiten diferenciar las nanopartículas según su tamaño. Estos métodos ofrecen infinitas posibilidades a la hora de desarrollar metodologías analíticas para la caracterización de NPs. En la Figura 7 se recoge un resumen de los métodos de separación más utilizados para el análisis de NPs.

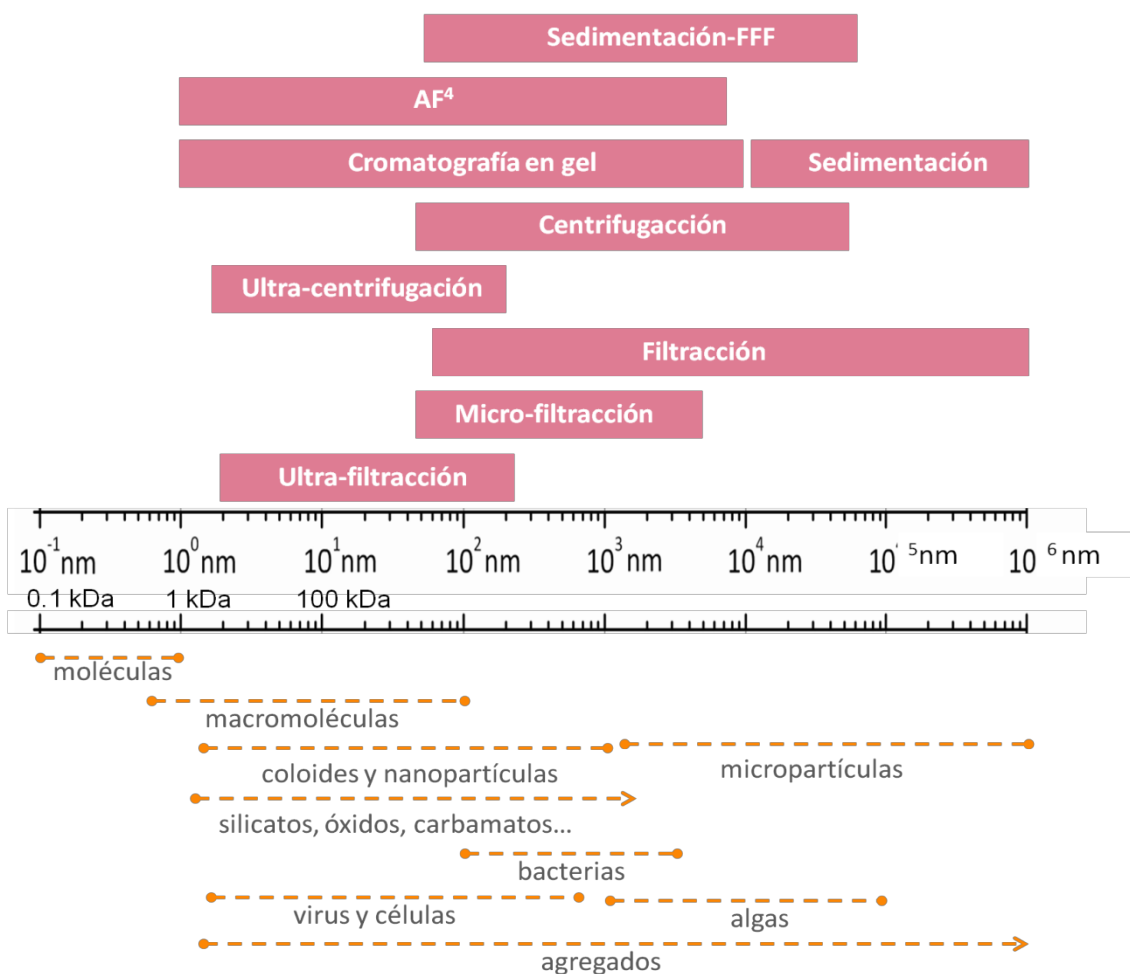


Figura 7. Técnicas disponibles para la separación de NPs según su tamaño

Centrifugación

Es una herramienta muy versátil y potente para la caracterización de NPs, pudiéndose aplicar a un rango muy amplio de masas moleculares (25 kDa a 1,5 MDa). La velocidad y tiempo de centrifugación dependen de la forma, tamaño, viscosidad y naturaleza de las NPs. Por ejemplo, en el caso de la separación de SeNPs estabilizadas con glutatión y tamaño en el intervalo de 40-90 nm se han empleado condiciones de 18000rpm / 10min (Vekariya *et al.* 2012), para ZnO-NPs con un tamaño 12 nm se han requerido tiempos mayores (alrededor de 1 h) debido al bajo tamaño de las NPs (Raghupathi *et al.* 2011), para NPs de azufre por debajo de 40nm se han utilizado velocidades de centrifugación de 4000rpm pero tiempos de 40 min (Soleimani *et al.* 2013). El empleo de filtros de corte de 10kDa durante la centrifugación resulta de gran utilidad para la separación de iones y exceso de reactivos, como en el caso de la síntesis de SeNPs empleando centrifugación a 4000g / 10min (Hu *et al.* 2008).

Las centrífugas comunes, disponibles en la mayoría de los laboratorios, permiten la separación de NPs por debajo de 500 nm, mientras que la ultra-centrifugación por debajo de 1 nm.

Filtración

Se presenta como una metodología adecuada no sólo para distinguir entre el elemento en forma iónica y en forma NPs, como en el caso de la centrifugación, sino también para obtener información sobre el tamaño de las mismas. Las membranas de filtración tradicionales permiten el fraccionamiento de partículas entre 0.2 y 1 μ m. Las técnicas de ultra- o nano-filtración emplean filtros con tamaño de poro más pequeños, llegando incluso a separar NPs por debajo de 3 a 1 nm. Para la separación de NPs e iones se suelen emplear filtros con un tamaño de poro entre 0.5 y 1 nm. La filtración secuencial se ha empleado con éxito para la determinación de AgNPs y Ag⁺ en productos textiles y eliminación de impurezas en Quantum Dots (QDs) (Wiecinski *et al.* 2009; Khan & Wang 2009).

Con excepción de la ultrafiltración, las técnicas de filtración convencionales, son fáciles de manejar y asequibles para la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, son

poco precisas, pudiendo proporcionar información errónea sobre el tamaño de las NPs debido a la obstrucción de los poros de la membrana, o a las interacciones electrostáticas entre el material empleado y las NPs.

Diálisis

Las ventajas de este método frente a la centrifugación y filtración se deben a que las NPs no están sujetas a procesos de separación invasivos y el tratamiento de muestra es rápido y simple. El método de diálisis generalmente emplea un gran volumen en el medio de liberación que favorece la difusión de todos los compuestos a través de la membrana (Cho *et al.* 2013). Es un procedimiento eficaz para eliminar impurezas (procedentes del medio de síntesis). Algunos ejemplos son la eliminación de impurezas en la preparación de SeNPs (Huang *et al.* 2013) o AgNPs (Chao *et al.* 2012).

II.2.2. Técnicas de separación basadas en la cromatografía y fraccionamiento de flujo

Técnicas de separación cromatográficas

Las técnicas basadas en la cromatografía por **exclusión de tamaños (SEC)** han sido muy empleadas para la caracterización de NPs, dado que esencialmente proporcionan información acerca del tamaño molecular. No obstante las grandes limitaciones de este mecanismo son: i) la baja resolución en la separación, ii) modificación de la integridad original de las NPs, especialmente el agente estabilizante, debido a las altas presiones y iii) las adsorciones inespecíficas de las partículas sobre el material poroso del relleno de la fase estacionaria (Rebolj *et al.* 2012).

En la **cromatografía hidrodinámica (HDC)** el uso de fase estacionaria no porosa reduce las interacciones en comparación con SEC (Hoque *et al.* 2012), sin embargo mediante esta técnica los datos obtenidos son en base al radio hidrodinámico, por lo que el tamaño de la NP puede diferir un poco con aquellos obtenidos mediante TEM. A pesar de la baja resolución de este método, su combinación con la detección UV o de fluorescencia, ha permitido la caracterización de NPs y coloides (Tiede *et al.* 2010) y AgNPs (Chao *et al.* 2012).

Fraccionamiento de campo de flujo (FFF-ICPMS)

El Fraccionamiento de campo de flujo (FFF) es una técnica de separación con flujo hidrodinámico asistido, diseñado para separar macromoléculas, coloides y partículas. Se puede considerar como una combinación de cromatografía de líquidos y una técnica de campo impulsada, excepto que no necesita una fase estacionaria.

Una de las grandes ventajas que presenta la técnica es que se puede acoplar “on line” con detectores como la espectroscopia UV-Vis, Fluorescencia, MALLS, ICP-MS e ICP-OES. La técnica de separación FFF engloba distintos mecanismos: FFF térmica (ThFFF), FFF sedimentación (SdFFF), FFF flujo asimétrico (AF⁴), FFF eléctrico (ElFFF) y FFF magnética (MgFFF) (Chao *et al.* 2012). La técnica FFF ofrece la separación de partículas de diferentes tamaños y, a diferencia de los métodos cromatográficos, la ausencia de una fase estacionaria evita la interacción irreversible con los analitos, manteniéndose tanto la morfología como el tamaño de los NPs.

En el **fraccionamiento con campo de flujo asimétrico (AF⁴)**, se aplica un flujo perpendicularmente al canal donde tiene lugar la separación, provocando la retención ó focalización de las partículas. En el interior de este canal se encuentra una membrana que actúa como filtro de corte (con un tamaño de poro específico) para diferenciar las partículas de especies iónicas en disolución. Debido a la amplia distribución de tamaño y diferentes propiedades fisicoquímicas, las partículas poseen distintos coeficientes de difusión (Bouby *et al.* 2008). Las NPs se separan como resultado de un equilibrio entre la fuerza aplicada perpendicularmente y este coeficiente de difusión. Este tipo de fraccionamiento puede operar en dos modos, modo normal ó modo estérico. El modo normal se establece cuando los diámetros de las partículas son mucho más pequeños que la anchura del canal y por consiguiente, tiene lugar una distribución exponencial, y las partículas más pequeñas eluyen primero. Por el contrario, la elución en modo estérico tiene lugar cuando se analizan partículas más grandes, y en este caso son las partículas de mayor diámetro las que eluyen antes. En la figura 8 se muestra un esquema del mecanismo de separación de NPs mediante AF⁴.

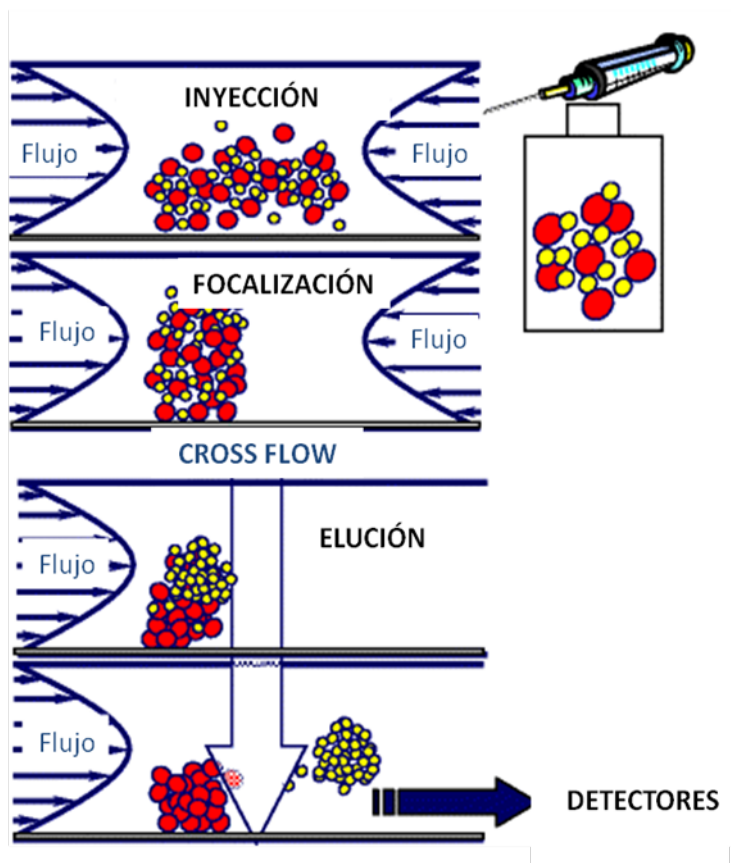


Figura 8. Mecanismo de separación de AF⁴

Aunque FFF ofrece buenas prestaciones en lo que respecta a la separación de NPs, la optimización de las condiciones de separación no es una tarea fácil. Existen multitud de parámetros que influyen en la eficiencia de la separación debido a fenómenos de adsorción, pre-elución, repulsión electrostática de la membrana y agregación de las NPs (Montoro Bustos *et al.* 2013). Los parámetros que más influyen en la separación son: composición y pH de la fase móvil, tipo de membrana y espesor, caudal del flujo perpendicular o “cross flow”, caudal de detector y tiempo de focalización y de inyección (Gigault, Pettibone, *et al.* 2014).

La técnica AF⁴ proporciona información directa sobre los coeficientes de difusión y tamaño de las NPs. Para ello se aplican dos ecuaciones: la ecuación de la teoría FFF (1) y la ecuación de Stokes-Einstein (2)

$$(1) \quad t_R = \frac{W^2}{6 \cdot D \cdot \ln\left(1 + \frac{F_c}{F_{out}}\right)}$$

$$(2) \quad D = \frac{K_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

Donde, t_r es el tiempo de retención, W el espesor del canal, D el coeficiente de difusión de las partículas, F_c el cross flow aplicado, F_{out} caudal del detector, K_B la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad del fluido y r el radio de las partículas.

De este modo, el tiempo de retención se puede relacionar con el tamaño de las partículas de forma sencilla. Sin embargo, la aplicación de la teoría FFF para la determinación de tamaños no siempre proporciona una información correcta. En casos en los que las NPs se encuentren agregadas, posean una morfología diferente a la esférica o establezcan interacciones con la membrana, estas ecuaciones no son útiles, siendo necesarios otros métodos de caracterización como la microscopía de transmisión electrónica o la técnica DLS.

En el caso de NPs esféricas y no agregadas, las ecuaciones (1) y (2) permiten la determinación del tamaño de las NPs con buena correlación con respecto a los valores proporcionados por TEM. Sin embargo, requiere conocer el valor de la viscosidad del fluido y muchas veces no se dispone de dicho valor. Una alternativa al empleo de la teoría del AF⁴, es el empleo de sustancias patrón de tamaño conocido que permitan relacionar los tiempos de retención de las NPs con los de los patrones, y así poder asignar el tamaño. En este sentido, existen patrones comerciales de AuNPs y de nanopartículas de látex de tamaño certificado. Lo más deseable es que la naturaleza de las NPs empleadas (analito y calibrante) tengan propiedades físico-químicas similares para que su interacción con la membrana sea la misma (Gigault, Nguyen, et al. 2014). Sin embargo, en algunos casos pese a que el calibrante y el analito poseen las mismas propiedades superficiales, e incluso tamaño, la influencia de la composición química de la NP puede contribuir a un diferente comportamiento en su interacción con la membrana. En el caso de nanopartículas metálicas, un efecto que influye en la retención y no aparece descrita en la ecuación clásica de FFF (ecuación 1) es la naturaleza del metal. En este sentido, Gigault & Hackley 2013, evaluaron el efecto de la composición química de las NPs en la separación de nanopartículas del mismo tamaño (100nm) pero distinta composición: Au, Se, Ti y nanopartículas de látex (PSL),

empleando las mismas condiciones de separación. Los resultados pusieron de manifiesto que la naturaleza del metal tiene una mayor influencia en la retención a medida que se incrementa su densidad. Esto explicaría que los tiempos de retención de SeNPs y PSL fueran idénticos (el selenio tiene una baja densidad) mientras que las AuNPs y TiO₂ NPs aparecían a tiempos de retención distintos, y diferentes entre ellos.

Una de las grandes ventajas de la técnica AF⁴ es su posibilidad de emplear como sistema de detección el ICPMS, especialmente para la caracterización de nanopartículas metálicas. El ICPMS aporta al sistema AF⁴, la posibilidad de realizar análisis multielemental e isotópico con una elevada sensibilidad (alcanzando los ng·L⁻¹), si se compara con la detección UV. A pesar de todas las ventajas proporcionadas por esta técnica, todavía existen algunas cuestiones que requieren una investigación más exhaustiva: problemas relacionados con la interacción membrana-NPs, el diferente comportamiento de las NPs dependiendo de su estructura química y la complejidad en la optimización de las condiciones de separación. Frente a las técnicas de microscopía electrónica, AF⁴ ofrece ventajas. La ventaja principal se basa en el número de partículas caracterizadas en cada análisis. Por ejemplo en AF⁴, en un volumen de inyección de 50 µL de una suspensión de NPs de concentración comprendida entre 1-10 mg·L⁻¹, el número de NPs (entre 1-100 nm) puede oscilar entre 10³-10⁷, mientras que en TEM el número de partículas analizadas es mucho menor, entre 150 y 2000. Esto se traduce en que, aunque es conveniente emplear TEM para la confirmación la información obtenida mediante AF⁴, esta es más representativa la muestra.

II.2.3. La técnica del ICPMS en el campo del análisis de nanopartículas metálicas

La técnica de **ICP-MS** se considera como la más adecuada para la cuantificación y caracterización de la composición elemental de NPs metálicas y para la determinación de impurezas metálicas en NPs no metálicas (Montoro Bustos *et al.* 2013). El empleo del ICPMS ofrece la posibilidad de la introducción directa de las NPs en el plasma. Sin embargo, ésto puede originar problemas debido a la baja eficiencia de nebulización en el caso de que las NPs se encuentren formando agregados de gran

tamaño. En la bibliografía aparecen datos contradictorios en relación a la nebulización de NPs. Mientras algunos autores han concluido que la introducción de las NPs menores de 2 μm , mediante nebulizadores tipo *slurry* tienen un comportamiento similar a los estándares acuosos comúnmente utilizados en ICP, otros han demostrado que esta técnica es sólo capaz de ionizar y atomizar NPs esféricas de tamaño comprendido entre 5 y 25 nm (Allabashi *et al.* 2009). Debido a esto, es conveniente evaluar en cada ensayo las posibles diferencias en la eficiencia de nebulización.

Una aproximación para subsanar estos problemas es realizar un proceso de cuantificación *off-line* mediante la digestión ácida de la dispersión de NPs o de fracciones recogidas a la salida un sistema AF⁴ y posterior medida por ICPMS. Son muchas las metodologías empleadas a tal efecto, desde el empleo de agua regia para AuNPs (Allabashi *et al.* 2009), H₂SO₄ para TiO₂-NPs (López-Heras *et al.* 2014) y HNO₃:H₂O₂ para CeO₂NPs (Fabricius *et al.* 2014). Una alternativa para la cuantificación y detección de nanopartículas es la técnica de **single-particle (sp)-ICPMS**. El principio de la técnica es muy sencillo y se basa en la excitación de una única NP obtenida tras la nebulización de dispersiones muy diluidas (normalmente se requieren concentraciones de 10⁹ NPs·L⁻¹) (Ulrich *et al.* 2012). Se considera que la excitación de una única partícula en el plasma produce una nube de iones cuya intensidad de señal es proporcional al tamaño de la partícula (Fabricius *et al.* 2014). El empleo de esta técnica requiere un bajo coste instrumental ya que se encuentra disponible en casi todos los laboratorios equipados con ICP-MS. A pesar de ello se requieren instrumentos con respuestas rápidas. La detección por sp-ICPMS va a depender de dos factores: (i) el tamaño de la nanopartícula, que debe ser lo suficientemente grande como para generar un número de iones detectables por el espectrómetro, y (ii) la concentración del número de NPs, que debe ser lo suficientemente alta como para permitir contar un número mínimo de eventos. Esto implica tener dos límites de detección: un límite de detección por tamaño (LOD_d) (que generalmente se encuentra entre 20 – 30 nm) y un límite de concentración del número de nanopartículas de detección (LOD_{NP}) (Bolea *et al.* 2011).

Laborda *et al.* han demostrado que la detección de sp-ICP-MS permite obtener información detallada, tanto cualitativa como cuantitativa, sobre las diferentes formas

físico-químicas de NPs en muestras acuosas sin etapas de separación anteriores para AgNPs de 18 nm (Laborda *et al.* 2011). En muestras medioambientales esta técnica también ha sido aplicada con éxito en AgNPs esféricas de 20 nm (Tuoriniemi *et al.* 2012).

A continuación en la tabla 7 se muestran algunos ejemplos concretos de aplicaciones de las distintas técnicas cuali- cuantitativas anteriormente desarrolladas en esta tesis doctoral, para el estudio y evaluación de SeNPs.

Para finalizar, las técnicas espectrofotométricas también se han empleado para el estudio de NPs aunque la información que proporcionan es más limitada y se reduce principalmente a información estructural y requiere de otras técnicas complementarias. Dentro de ellas cabe destacar, la espectroscopía: IR, RAMAN y UV-Vis.

Tabla 7. Aplicaciones de técnicas cualitativas y cuantitativas para el análisis de SeNPs

Analito	Matriz	Método de Separación	Condiciones	Caracterización	Referencia
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con glutatión)	Centrifugación	Centrifugación 18000 rpm/10min	Cualitativa: TEM, UV-Vis	(Vekariya et al. 2012)
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con polisacáridos)	Floculación	Suspensión en H ₂ O	Cualitativa: TEM, EDS, UV-Vis	(Chris Wang & Lin 2005)
SeNPs sintetizadas	Bacteria (<i>Pantoea Agglomerans</i>)	Centrifugación	Centrifugación 4100 rpm / 5min	Cualitativa: TEM, SEM, EDS	(Torres et al. 2012)
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con glutatión y BSA)	Diálisis	Diálisis con H ₂ O durante 72h	Cualitativa: TEM, DLS	(Kong et al. 2011)
SeNPs	Órganos de rata		Liofilización; digestión con HNO ₃ : H ₂ O ₂	Cuantitativa: ICPMS	(Gao et al. 2014)
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con transferrina y chitosan)	Diálisis	Diálisis con H ₂ O durante 6h	Cualitativa: TEM, SEM, FTIR Cuantitativa: ICP-AES	(Huang et al. 2013)
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con dendrímeros)	Centrifugación	Centrifugación 5000 rpm/20min	Cualitativa: TEM, EDX, FTIR Cuantitativa: ICP-AES	(Zheng et al. 2014)
SeNPs	Vegetal (<i>Raphanus Sativus</i>)	Sonicación	Extracción con baño ultrasonidos Digestión ácida con HNO ₃ : H ₂ O ₂	Cualitativa: TEM, EDX, AF ⁴ -UV-ICPMS Cuantitativa: ICP-MS	(Palomo-Siguero et al. 2014)
SeNPs sintetizadas	Bacteria (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	Centrifugación	Centrifugación 14000 rpm / 15min	Cualitativa: TEM, UV-Vis, EDX	(Rezvanfar et al. 2013)

SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con ácido hialurónico)	Diálisis	Diálisis con H ₂ O / 48h (1) Digestión ácida HNO ₃ :HClO ₄ 12h/t.a. (2) evaporación (3) HCl 6M y dilución con H ₂ O	Cualitativa: TEM Cuantitativa Se: ICP-AES	(Ren et al. 2013)
SeNPs	Fluidos gastrointestinales	AF ⁴ -UV-ICPMS	Recogida de fracciones	Cualitativa: TEM, AF ⁴ -UV-ICPMS Cuantitativa: AF ⁴ -UV-ICPMS Cuantitativa : ICP-MS	(M-M et al. 2014)
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con BSA)	Diálisis	Diálisis con H ₂ O / 48h	Cualitativa: TEM, DLS	(Wang et al. 2014)
CdSe/ZnS QDs	<i>Daphnia Magna</i>	Ultra-Filtración	Fitros de 3kDa	Cualitativa: DLS, AF ⁴ -UV-ICPMS Cuantitativa: ICP-AES	(Pace et al. 2010)
CdSe/ZnS QDs	Fluidos gastrointestinales	Centrifugación	Centrifugación 5000g/120min Filtros 10kDa	Cualitativa: UV-Vis, DLS, FTIR Cuantitativa: ICP-OES	(Wiecinski et al. 2009)
SeNPs sintetizadas	Gel (estabilización con gelatina)	Diálisis	Diálisis con H ₂ O/4-5 días/4-7°C	Cualitativa: TEM, XRD, RAMAN	(Raevskaya et al. 2008)
SeNPs sintetizadas	Bacterias (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)	Centrifugación	Centrifugación 5000g/10min	Cualitativa: TEM, EDX	(Di Gregorio et al. 2005)
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con fibroína)	Filtración	Filtración y secado 40°C	Cualitativa: AFM, XRD	(Xia 2007a)
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con L-cisteína)	Centrifugación	Centrifugación 4000rpm/10min	Cualitativa: TEM, XRD, UV-Vis, RAMAN	(Chen et al. 2009)
SeNPs sintetizadas	Solución acuosa (estabilización con complejo de Ru)	Centrifugación	Ciclos de sonicación y centrifugación con H ₂ O 4500rpm/10min	Cualitativa: TEM, SEM, EDX	(Sun et al. 2014)

III. METODOLOGÍAS (BIO)ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN A SELENIO Y NANOPARTÍCULAS DE SELENIO

Los estudios toxicológicos son cada vez más necesarios para entender tanto la interacción entre las NPs y el medio ambiente, como los efectos de éstas sobre los organismos vivos. Aunque no existen unas condiciones experimentales estándar bajo las cuales se deban llevar a cabo este tipo de ensayos, sí que se han planteado una serie de parámetros críticos que deben ser objeto de estudio e incluyen: estudio de la morfología celular e integridad del citoesqueleto, funcionalidad celular e identificación de proteínas y/o marcadores. A continuación se detallan las técnicas (bio)analíticas más comunes utilizadas en la evaluación de dichos parámetros.

III.1. Medida de la Viabilidad Celular

La evaluación del efecto de las NPs sobre la viabilidad celular puede llevarse a cabo mediante la aplicación de uno o varios ensayos que incluyen la integridad de la membrana celular, la actividad metabólica o mitocondrial, estrés oxidativo o los niveles de apoptosis (evaluando las interacciones de Anexina V o la actividad de las caspasas).

III.1.1. Integridad de la membrana celular

La membrana celular es una membrana delgada semi-permeable que rodea al citoplasma de la célula y constituye una barrera funcional. Su función es la de mantener la integridad de la célula y controlar el transporte de entrada y salida celular, el cual es regulado por transportadores, receptores y rutas metabólicas de secreción. Puesto que los compuestos citotóxicos a menudo comprometen la membrana celular, la evaluación de integridad de la misma es una de las formas más comunes para medir la viabilidad celular y efectos citotóxicos.

La integridad de la membrana puede evaluarse controlando la presencia en los medios de cultivo de sustancias que normalmente se encuentran en el interior de las células sanas (Luque-Garcia *et al.* 2013). Una medida comúnmente empleada es la **lactato deshidrogenasa (LDH)**. LDH es una enzima citoplasmática, la cual se manifiesta cuando la membrana celular se ve dañada; por lo que la actividad de esta enzima en el medio indica la proporción de células no viables (Cho *et al.* 2013). Existen varios kits disponibles comercialmente para llevar a cabo este ensayo, que no implican ningún tipo de preparación de la muestra ya que se añaden directamente a los medios de cultivo y el producto de reacción resultante (formazán rojo) se mide espectrofotométricamente. Utilizando el marcaje de LDH, Hussain *et al.* pusieron de manifiesto que la exposición a NPs de MoO₃, Al, Fe₃O₄, MnO₂, y W no produce citotoxicidad en células de hígado de rata hasta un nivel de exposición de 100 mg·mL⁻¹, mientras que AgNPs resultaron ser altamente tóxicas en esas concentraciones para las mismas células (Hussain *et al.* 2005).

Otros procedimientos para estudiar la viabilidad celular implican el empleo de marcadores fluorescentes tales como azul de tripano y yoduro de propidio (IP); que son compuestos capaces de atravesar libremente la membrana celular cuando ésta ha sido dañada provocando la tinción de componentes intracelulares, mientras que no afectan a las células sanas. El uso combinado de estos marcadores junto con la citometría de flujo (FCM), permite el conteo de células vivas (membrana celular íntegra) y células dañadas (Kramer *et al.* 2009).

La **citometría de flujo** (FC, Flow Cytometry) es una técnica de análisis celular que mide las características morfológicas (mediante la dispersión de luz) y antigénicas (mediante la señal de fluorescencia) que poseen las células. Los citómetros de flujo constan de una fuente de excitación (láser) y de un sistema colector para generar y recoger las señales luminosas a determinadas longitudes de onda, y posteriormente dirigirlas hacia los detectores ópticos. Las células se introducen en el citómetro en suspensión mediante un sistema hidráulico. Esta técnica es muy versátil y se puede aplicar en el análisis de diferentes niveles celulares: a nivel molecular (proteínas extracelulares, secuencias de ADN ó ARN), a nivel subcelular (liposomas, núcleos, cromosomas y otros orgánulos aislados), a nivel celular (bacterias, hongos, células animales y vegetales) y a nivel supracelular (organismos pluricelulares y fusiones celulares). El empleo de kits comerciales de tinción que implican: i) **marcación de ácidos nucleicos con SYTOX** el cual discrimina en base a la integridad de membrana ó ii) **marcación de** enzimas liberadas (esterasa) tras la ruptura de la membrana celular como la 6-carboxifluoresceína diacetato (cFDA), combinados con los marcadores de ácidos nucleicos (DAPI ó IP), son empleados habitualmente para el estudio de la viabilidad bacteriana en aplicaciones alimentarias y medioambientales. La selección del procedimiento más adecuado dependerá de varios factores incluyendo la fisiología celular e información requerida (Zotta *et al.* 2012). De hecho, en bacterias ácido lácticas, el empleo de distintos tipos de marcación es una constante en los trabajos de investigación, sin seguir protocolo alguno para su elección (Rault *et al.* 2007; Geng *et al.* 2014; Bensch *et al.* 2014).

Como cualquier técnica de análisis, la FC presenta ventajas e inconvenientes. Entre sus ventajas destacan: el análisis de un número significativo de células, la

posibilidad de medir células individuales, y de utilizar múltiples marcajes en una sola célula con el objetivo de evaluar diferentes parámetros. Sin embargo, la información sobre la morfología celular es escasa y es incapaz de proporcionar información de la localización del analito en un tejido.

III.1.2. Actividad metabólica

Una indicación temprana de daño celular es una reducción en la actividad metabólica. Por lo tanto, los ensayos que permiten la medida de las funciones metabólicas tales como los niveles de ATP o actividad mitocondrial se han empleado frecuentemente para evaluar la toxicidad de las nanopartículas metálicas. Uno de los métodos más ampliamente utilizados es el **ensayo con 3-(4, 5-dimetil-2-8 tiazolil)-2, bromuro de 5-difenil-2H-tetrazolio (MTT)**, que mide el potencial de reducción de la célula. Se basa en la capacidad de las células sanas para reducir el MTT a formazán mediante la acción de las reductasas mitocondriales. El formazán es un compuesto coloreado cuya absorbancia se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda entre 500-600 nm. Las células se incuban con MTT entre 4-5 horas y, los cristales formados de formazán se disuelven en sulfóxido de dimetilo (DMSO) (u otro disolvente orgánico) antes de su detección colorimétrica.

El ensayo con MTT se ha empleado para estudiar la citotoxicidad de distintos tipos de NPs. Así, la exposición de la línea celular MCF-7 a SeO_2 y SeNPs, demostró el menor efecto citotóxico de las NPs en comparación con el Se(IV). La concentración necesaria para causar el 50% de la muerte celular (IC_{50}) en células tratadas con SeNPs fue de $41.5 \pm 0.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sin embargo este mismo efecto con SeO_2 fue producido a muy bajas concentraciones $6.7 \pm 0.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Forootanfar *et al.* 2014). También este ensayo se aplicó con éxito en bacterias lácticas para evaluar el papel protector del Se frente al Cd (Araúz, Afton, Wrobel, Caruso, *et al.* 2008).

III.1.3. Evaluación del estrés oxidativo

El estrés oxidativo está asociado a un incremento en la producción de especies oxidantes o a una significativa disminución de las defensas antioxidantes celulares. Cuando las células son expuestas a condiciones de estrés pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS), entre las que se encuentran radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), aniones superóxido (O^{2-}), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Cuando la concentración de estas especies es muy elevada, se produce daño celular e incluso apoptosis. Muchos estudios han considerado el aumento de los niveles de ROS como uno de los efectos inducidos por las NPs.

Uno de los ensayos más usados para medir la producción intracelular de ROS es el **diacetato de diclorofluoresceína ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate)**. Se trata de un compuesto exógeno, hidrofóbico y no fluorescente que rápidamente penetra en la célula por difusión pasiva, donde se hidroliza a diclorofluoresceína (DCFH) por la acción de esterasas y, posteriormente se oxida por la presencia de ROS a la forma fluorescente diclorofluorescina (DCF) (von Moos & Slaveykova 2014). Este método ha sido ampliamente aplicado tanto en organismos eucariotas (Wang *et al.* 2014) como procariotas (Battin & Brumaghim 2009b). Siguiendo este procedimiento, Konczol y col. demostraron que la producción de ROS en células epiteliales aumentó tras la incubación con NPs de Fe_2O_3 , siendo este efecto dependiente del nivel de exposición (Könczöl *et al.* 2011).

La **determinación de glutatión (GSH)** proporciona también buenos resultados para la detección de los niveles de ROS por debajo de la concentración crítica que induce estrés oxidativo. La relación GSH y disulfuro glutatión (GSSG) es un buen indicador de desequilibrio, dado que se encarga de regular el balance redox y funciona como indicador de protección o daño celular (M. Wang *et al.* 2007).

Por último, la **peroxidación lipídica** es la medida indirecta más común ya sea por determinación de productos de peroxidación secundarios tales **como malondialdehído (MDA), TBARS o dienos conjugados** (por espectrofotometría) ó por determinación de la composición de lípidos. Ambos MDA y TBARS, se emplean

habitualmente para la evaluación de los efectos de la exposición de bacterias y células eucariotas a NPs. De esta forma se han detectado elevadas concentraciones de MDA en una gran variedad de microalgas, incluyendo *C. Reinhardtii* tras su exposición a NPs de (0.1–100 mg·L⁻¹) durante 8 h, mostrando signos de aclimatación y regeneración después de 72 h (von Moos & Slaveykova 2014). En otro estudio se detectó un incremento del nivel de MDA en riñón de ratones expuestos a SeMet y SeNPs durante 6h. Los mayores niveles de MDA en presencia de SeMet en comparación a SeNPs podría indicar que las SeNPs producen un menor estrés oxidativo (H. Wang *et al.* 2007).

III.1.4. Medida del grado de apoptosis

La exposición de las células a NPs puede incrementar la producción de ROS y peroxidación lipídica, como se ha descrito previamente, pudiendo causar en último momento la apoptosis celular. La apoptosis es una forma regulada genéticamente de muerte celular programada, esencial para el desarrollo y viabilidad de los organismos. Los cambios fisiológicos implicados en el proceso incluyen la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, exposición de la fosfatidilserina (PS) al exterior celular y proliferación de caspasas. A pesar de que existen varias estrategias para evaluar la apoptosis celular utilizando proteínas como marcadores, como Bax, Bcl2, p53 y caspasas. Sin embargo, los dos métodos más comunes son: medida del potencial de la membrana mitocondrial y el ensayo con Anexina-V, combinados con la citometría de flujo.

La mitocondria actúa como punto de integración de las señales apoptóticas originadas tanto por mecanismos extrínsecos como intrínsecos, la pérdida de potencial de membrana mitocondrial puede estar asociada a la activación de las caspasas y a la consiguiente activación de las cascadas apoptóticas. Mediante este procedimiento, Chen y col. demostraron que las SeNPs potenciaban la apoptosis de células de melanoma humanas (T. Chen *et al.* 2008). El porcentaje de células con la membrana

despolarizada aumentó aproximadamente un 25 % cuando las células fueron tratadas con las NPs.

La anexina-V combinada con la citometría de flujo es otro ensayo empleado para la medida de apoptosis. La anexina-V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina (PS, phosphatidylserine), el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. De esta forma, la anexina-V conjugada con un fluoróforo como el FITC, puede identificar selectivamente a las células apoptóticas uniéndose a la PS. La anexina-V se utiliza generalmente junto con el ioduro de propidio (IP) que, como se ha comentado anteriormente, es un fluorocromo no covalente que se une al ADN celular de células en las que la membrana está totalmente dañada. De esta forma es posible diferenciar entre células apoptóticas (positivas a la anexina) y células necróticas (muerte celular provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar). Es importante mencionar que ciertos fluorocromos pueden ser adsorbidos en la superficie de las NPs, pudiendo causar la fluorescencia de las mismas, alterando así los resultados del ensayo de la citometría de flujo. Además, la internalización celular o deposición de NPs puede impedir la correcta unión de los fluorocromos a sus moléculas diana. (Luque-Garcia *et al.* 2013).

En el caso de bacterias, no podemos hablar de proceso apoptótico como tal con la aplicación del ensayo de Anexina-V, sino más bien se debe hablar de inducción a la exposición de PS (Dwyer *et al.* 2012). En las bacterias, los niveles de PS generalmente representan un porcentaje muy bajo dentro de los fosfolípidos que conforman la membrana celular bacteriana (Matsumoto 1997), debido a su rápida conversión a fosfatidiletanolamina por acción de la enzima fosfatidildescarboxilasa (Psd) (Schuiki & Daum 2009). Es cierto que algunos autores consideran la existencia de apoptosis en organismos procariotas como resultado de la evolución y en un mecanismo similar a las eucariotas, y como respuesta a estrés terminal. A modo de ejemplo, Dwyer *et al.* 2012. observaron la presencia de marcadores apoptóticos (RecA, ClpP, exposición de PS, condensación de cromatina, fragmentación ADN) en la exposición de determinadas bacterias a la presencia de antibióticos (Dwyer *et al.* 2012).

III.2. Internalización y Localización Intracelular

Cuando se estudia la interacción de NPs con organismos vivos y células, uno de los factores clave es la evaluación de la internalización y localización de las NPs en el interior celular y tejidos. La cuantificación de NPs metálicas acumuladas en la célula o en la bacteria se lleva a cabo principalmente mediante técnicas analíticas sensibles como ICP-MS previa digestión ácida del pellet bacteriano o celular. Sin embargo la localización de las NPs requiere la aplicación de una técnica análisis de resolución espacial, como técnicas microscópicas. Sin embargo, los protocolos de preparación de la muestra son diferentes a los empleados para la caracterización de NPs por tamaño y morfología. A continuación, se describen brevemente las técnicas microscópicas más empleadas para la localización intracelular de NPs.

III.2.1. Técnicas microscópicas

La exposición a agentes citotóxicos puede provocar alteraciones morfológicas en membrana celular y / o forma de la célula. Por lo tanto, no es sorprendente que la visualización de las alteraciones morfológicas se considere como un índice primario de la toxicidad. Los efectos citotóxicos de las NPs sobre una determinada línea celular pueden diferir dependiendo del tiempo de exposición y la concentración de NPs en el medio de cultivo. Es importante comentar que es la concentración de nanopartículas internalizadas la que va a tener influencia real sobre los efectos citotóxicos. Por este motivo, la obtención de información sobre la localización intracelular de las NPs es de vital importancia para poder establecer las interacciones que tienen lugar entre las NPs y células. La asimilación de NPs por parte de la célula no sólo depende de la concentración inicial de éstas, sino de otras propiedades como su tamaño, forma, agente estabilizante, y carga superficial de las NPs.

Dentro de las técnicas de microscopía, son el TEM, SEM y AFM las más empleadas para este tipo de ensayos. La técnica **SEM** permite la visualización de alteraciones en la morfología celular y la **TEM** diferencia las NPs localizadas en el interior de la célula o tejidos con respecto a aquellas que se encuentran adheridas a la

superficie. A la hora de llevar a cabo un análisis de este tipo es necesario emplear agentes fijadores como: aldehídos (glutaraldehído y paraformaldehído), que se unen a grupos amino preservando la estructura celular, y tetraóxido de osmio, usado generalmente como fijador secundario, que se une a lípidos insaturados y a algunas proteínas mejorando la densidad electrónica. Mediante esta técnica se ha puesto de manifiesto cambios en la apariencia de las vacuolas y un incremento de las vesículas lipídicas en *Saccharomyces Cerevisae* después de su exposición a NPs de CuO, ZnO, TiO₂ y Ag (Bayat *et al.* 2014).

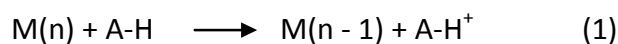
Además de la microscopía electrónica, existen otras técnicas como la técnica de **imagen de ultra-alta resolución (URI, Ultrahigh Resolution Imaging)**. Ésta es una técnica que permite observar las interacciones entre NPs y células de una manera directa, sin necesidad de una tediosa preparación de muestra y sin la utilización de agentes fluorescentes. Simplemente, variando el plano focal se pudo verificar la asimilación por parte de las células de agregados de TiO₂NPs. Sun y col. emplearon la **microscopía de fluorescencia (FM, Fluorescence Microscopy) o CLM**, para la visualización *In vivo* y *Ex Vivo* de la disminución del tamaño de tumores en tejidos de corazón, hígado, riñón y pulmón de ratas tras su exposición a SeNPs, en este caso la marcación se realizó con la funcionalización de las NPs con un complejo de Ru fluorescente (Sun *et al.* 2014). Sin embargo es importante comentar que la funcionalización de las NPs puede alterar sus propiedades físico-químicas originales. Entre los fluorocromos más utilizados en bio-análisis se encuentran: FITC, ALEXA 488, BODIPY-FL, ioduro de propidio, Mito-Tracker Red y Rodamina, entre otros. Por último, la **Microscopia de Campo Oscuro (DFM, Dark Field Microscopy)** es capaz de proporcionar una visión general de las NPs no fluorescentes en el interior de las células, ya que como resultado se ve una imagen brillante superpuesta a un campo oscuro. Los estudios utilizando esta técnica son muchos más limitados, y comúnmente se emplea en el análisis de NPs de Au y Ag (Joshi *et al.* 2008). Una ventaja de este método es la alta resolución para muestras con distintos tipos de NPs o agregación de ellas; a pesar de que requiere altas diluciones de la muestra para que no se superpongan las imágenes (Cho *et al.* 2013).

IV. METODOLOGÍAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Determinación de la Capacidad Antioxidante

El estrés oxidativo y la producción incontrolada de especies reactivas de oxígeno (ROS) se han identificado como una de las razones más importantes de la progresión patológica de muchas enfermedades y varios tipos de cánceres. Las células han desarrollado diferentes mecanismos para defenderse del efecto peligroso de los ROS, tales como la conversión enzimática de radicales libres y detoxificación mediante el empleo de antioxidantes. En la actualidad existe un gran interés en el estudio de nuevos compuestos con propiedades antioxidantes, uno en los que se centra esta memoria son las SeNPs. Las excelentes propiedades biológicas de las SeNPs junto con su baja toxicidad han generado un gran interés y están introduciendo a esta forma de Se como un buen candidato para reemplazar a otras formas de Se en alimentos y suplementos nutricionales y en la preparación de materiales con capacidad antioxidante.

Los compuestos antioxidantes se pueden clasificar en dos categorías dependiendo de su naturaleza: antioxidantes naturales (ricos en compuestos fenólicos y presentes principalmente en vegetales, frutas, aceites esenciales...)(Ou *et al.* 2002; J.R. Liu, M.J. Chen 2005) y, antioxidantes sintéticos. Los métodos más empleados para la determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto (natural o sintético) incluyen **la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC), la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)** y, **el potencial antioxidante reductor férrico (FRAP)** (Dudonne *et al.* 2009). Estos métodos han sido clasificados en dos grupos en función de los mecanismos de reacción: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y transferencia electrónica (ET) (Roy *et al.* 2010).



En los métodos basados en ET (reacción 1) como FRAP, TEAC y DPPH los compuestos antioxidantes son oxidados. Como resultado, se transfiere un único electrón desde la molécula antioxidante al oxidante. La variación en la Absorbancia permite cuantificar la capacidad reductora del antioxidante (Ou *et al.* 2002).

Los métodos basados en HAT (reacción 2 y 3) como ORAC, utilizan un iniciador radical para generar radicales peróxidos ROO^\bullet , los cuales van a captar el átomo de hidrógeno de un compuesto antioxidante preferentemente. Como resultado, la reacción entre ROO^\bullet y la molécula fluorescente empleada como marcador modifica su fluorescencia.

En el caso del **método DPPH**, la captura del DPPH por los antioxidantes produce una disminución de la Absorbancia a 515 nm (Pieniz *et al.* 2014). Este método se ha aplicado para la determinación de la capacidad antioxidante de las SeNPs. Las conclusiones más relevantes de este tipo de estudios es que, por un lado; la capacidad antioxidante de las SeNPs depende de su tamaño, con los valores óptimos en el

intervalo de 5-200 nm (Peng *et al.* 2007), y por otro que las SeNPs presentan una mayor capacidad antioxidante que el selenito (Forootanfar *et al.* 2014). Paradójicamente, los resultados obtenidos tras la comparación con el método FRAP demostraron una tendencia inversa, es decir las SeNPs ofrecen menor capacidad antioxidante, lo que se atribuyó a la parcial solubilización de las SeNPs en el medio de reacción empleado en el FRAP.

En el **método FRAP**, los compuestos antioxidantes presentes en la muestra reducen el complejo Fe^{3+} /tripiridiltriazina presente en exceso estequiométrico a Fe^{2+} , provocando un incremento de la Absorbancia a 593 nm. Dicho incremento es proporcional al potencial antioxidante de los compuestos ensayados (Ou *et al.* 2002). Las limitaciones que presenta esta metodología, es por un lado la lenta cinética que presenta la reacción no siendo práctico su uso y, por otro lado, las posibles interferencias debido a la absorción a 593 nm de otros compuestos (como por ejemplo, extractos vegetales coloreados) donde ORAC no presentaba inconvenientes (Prior *et al.* 2003).

La metodología seguida mediante el **método TEAC**, es similar a la empleada por DPPH, salvo en el empleo del ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox, un análogo de la vitamina E) en lugar del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Prior *et al.* 2003), midiéndose la Absorbancia a 734 nm. Este método fue el empleado para determinar la capacidad antioxidante de una nueva especie de selenio encontrada en pescados, selenoneína (Yamashita & Yamashita 2010). También se ha empleado para evaluar la capacidad antioxidante de SeNPs en el rango de 5-200 nm (Huang *et al.* 2003), observándose en todos los casos que el efecto “scavenging” es muy superior al observado con Na_2SeO_3 para una misma concentración de Se.

Sin embargo, el método que presenta mayor relevancia para la determinación de la capacidad antioxidante es el **método ORAC** (Prior *et al.*, 2003). En el método modificado por Pezo *et al.* de **radicales libres** (Pezo *et al.* 2008), se genera una corriente de radicales hidroxilo OH^\bullet mediante una lámpara UV y una corriente de H_2O_2 , estos radicales van a ser atrapados por los compuestos antioxidantes y el exceso de radicales reacciona con el ácido salicílico, generando el compuesto ácido 2,5-

dihidroxibenzoico (2,5-DHB) el cual se determina su fluorescencia a 474 nm. De esta manera se puede determinar de forma directa la capacidad antioxidante de un compuesto y la hidroxilación ó formación de 2, 5-DHB.

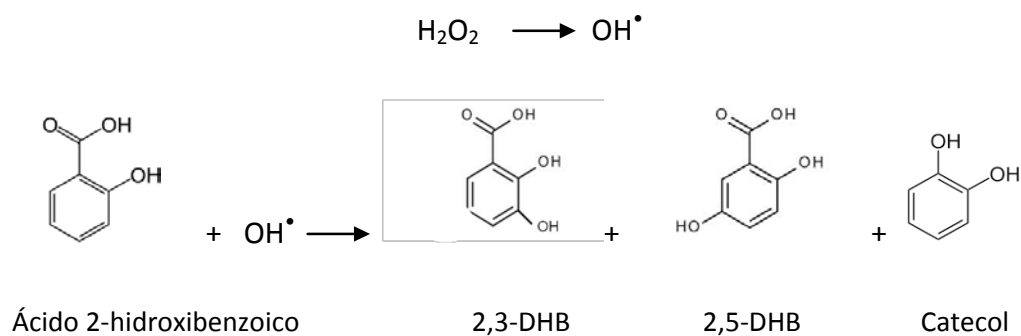


Figura 9. Reacciones producidas en el método ORAC

El método ORAC requiere equipamiento más caro y tiempos de ensayo más largos, pero es hasta la fecha el único método que tiene en cuenta la acción de los radicales libres (Dudonne *et al.* 2009).

Síntesis, Caracterización y Toxicidad de Nanopartículas de Selenio.
Aplicación en el Desarrollo de Envases Antioxidantes

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, E.J., 2008. The HLD–NAC equation of state for microemulsions formulated with nonionic alcohol ethoxylate and alkylphenol ethoxylate surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 320(1-3), pp.193–204.
- Acosta, E.J. & Bhakta, A.S., 2009. The HLD-NAC model for mixtures of ionic and nonionic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 12(1), pp.7–19.
- Adams, L., Lyon, D. & Alvarez, P., 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40(19), pp.3527–32.
- Aesan, 2011. MICRONUTRIENTES -Datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE).
- Aguilar, F. et al., 2009. EFSA-Q-2005-170, EFSA-Q-2006-306, EFSA-Q-2006-308 Se-methyl-L-selenocysteine added as a source of selenium for nutritional purposes to food supplements. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food Adopted on 28 Apr. *EFSA Journal*, 1067, pp.1–23.
- Allabashi, R. et al., 2009. ICP-MS: A powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(8), pp.2003–2011.
- Alzate, a. et al., 2008. Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp.8728–8736.
- Alzate, A. et al., 2007. Evaluation of the inorganic selenium biotransformation in selenium-enriched yogurt by HPLC-ICP-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp.9776–9783.

- Amoako, P.O., Uden, P.C. & Tyson, J.F., 2009. Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds. *Analytica Chimica Acta*, 652(1-2), pp.315–323.
- Anestål, K. et al., 2008. Cell death by SecTRAPs: Thioredoxin reductase as a prooxidant killer of cells. *PLoS ONE*, 3(4).
- Araúz, I.L.C., Afton, S., Wrobel, K., Caruso, J. a., et al., 2008. Study on the protective role of selenium against cadmium toxicity in lactic acid bacteria: An advanced application of ICP-MS. *Journal of Hazardous Materials*, 153(3), pp.1157–1164.
- Araúz, I.L.C., Afton, S., Wrobel, K., Caruso, J. a, et al., 2008. Study on the protective role of selenium against cadmium toxicity in lactic acid bacteria: an advanced application of ICP-MS. *Journal of hazardous materials*, 153(3), pp.1157–64.
- Artiaga, G. et al., 2015. Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS. *Food Chemistry*, 166, pp.76–85.
- B'Hymer, C. & Caruso, J. a, 2006. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1114(1), pp.1–20.
- Bai, Y. et al., 2008. Modification and modulation of saccharides on elemental selenium nanoparticles in liquid phase. *Materials Letters*, 62(15), pp.2311–2314.
- Ballihaut, G., Kilpatrick, L.E. & Davis, W.C., 2011. Detection, Identification, and Quantification of Selenoproteins in a Candidate Human Plasma Standard Reference Material. , pp.8667–8674.
- Battin, E.E. & Brumaghim, J.L., 2009a. Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55, pp.1–23.

- Battin, E.E. & Brumaghim, J.L., 2009b. Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), pp.1–23.
- Battin, E.E., Perron, N.R. & Brumaghim, J.L., 2006. The central role of metal coordination in selenium antioxidant activity. *Inorganic Chemistry*, 45(2), pp.499–501.
- Bayat, N. et al., 2014. The effects of engineered nanoparticles on the cellular structure and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nanotoxicology*, 8(March), pp.363–73.
- Beckett, G.J. & Arthur, J.R., 2005. Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*, 184(3), pp.455–465.
- Beheshti, N. et al., 2013. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: in vitro and in vivo studies. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 27(3), pp.203–7.
- Bellinger, F.P. et al., 2009. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *The Biochemical journal*, 422(1), pp.11–22.
- Bensch, G. et al., 2014. Flow cytometric viability assessment of lactic acid bacteria starter cultures produced by fluidized bed drying. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), pp.4897–909.
- Bianga, J., Govasmark, E. & Szpunar, J., 2013. Characterization of selenium incorporation into wheat proteins by two-dimensional gel electrophoresis-laser ablation ICP MS followed by capillary HPLC-ICP MS and electrospray linear trap quadrupole orbitrap MS. *Analytical Chemistry*, 85(4), pp.2037–2043.
- Bierla, K. et al., 2013a. A comparative study of the Se/S substitution in methionine and cysteine in Se-enriched yeast using an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS)-assisted proteomics approach. *Journal of proteomics*, 87, pp.26–39.

- Bierla, K. et al., 2013b. A comparative study of the Se/S substitution in methionine and cysteine in Se-enriched yeast using an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS)-assisted proteomics approach. *Journal of proteomics*, 87, pp.26–39.
- Bierla, K., Dernovics, M., et al., 2008. Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(7), pp.1789–1798.
- Bierla, K., Szpunar, J. & Lobinski, R., 2008. Specific determination of selenoaminoacids in whole milk by 2D size-exclusion-ion-pairing reversed phase high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP MS). *Analytica Chimica Acta*, 624(2), pp.195–202.
- Bird, S.M. et al., 1997. High-performance liquid chromatography of selenoamino acids and organo selenium compounds. Speciation by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 789(1-2), pp.349–359.
- Bolea, E. et al., 2011. An approach to the natural and engineered nanoparticles analysis in the environment by inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307(1-3), pp.99–104.
- Bouby, M., Geckeis, H. & Geyer, F.W., 2008. Application of asymmetric flow field-flow fractionation (AsFFFF) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) to the quantitative characterization of natural colloids and synthetic nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(7-8), pp.1447–1457.
- Buettner, C., Harney, J.W. & Berry, M.J., 1999. The *Caenorhabditis elegans* homologue of thioredoxin reductase contains a selenocysteine insertion sequence (SECIS) element that differs from mammalian SECIS elements but directs selenocysteine incorporation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), pp.21598–21602.

- Burk, R.F. & Hill, K.E., 2005. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annual review of nutrition*, 25, pp.215–235.
- Caruso, J. a & Montes-Bayon, M., 2003. Elemental speciation studies--new directions for trace metal analysis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 56(1), pp.148–163.
- Chao, J. et al., 2012. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33, pp.95–106.
- Chen, H., Seiber, J.N. & Hotze, M., 2014. ACS select on nanotechnology in food and agriculture: A perspective on implications and applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), pp.1209–1212.
- Chen, J., 2012. An original discovery: Selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 21(3), pp.320–326.
- Chen, T. et al., 2008. Selenium nanoparticles fabricated in Undaria pinnatifida polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(1), pp.26–31.
- Chen, X. et al., 1980. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biological Trace Element Research*, 2(2), pp.91–107.
- Chen, Z. et al., 2008. Comparison of no gas and He/H₂ cell modes used for reduction of isobaric interferences in selenium speciation by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 63(1), pp.69–75.
- Chen, Z. et al., 2009. L-Cysteine-assisted controlled synthesis of selenium nanospheres and nanorods. *Crystal Growth and Design*, 9(3), pp.1327–1333.

- Cho, E.J. et al., 2013. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), pp.2093–2110.
- Chris Wang, C.R. & Lin, Z.-H., 2005. Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 92(2-3), pp.591–594.
- Conley, J.M. et al., 2014. Dynamic Selenium Assimilation, Distribution, Efficiency, and Maternal Transfer in Japanese Medaka Fed a Diet of Se-enriched Mayflies.
- Cubadda, F. et al., 2010. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), pp.2295–2301.
- Cuderman, P. & Stibilj, V., 2009. How critical is the use of commercially available enzymes for selenium speciation? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(3), pp.1007–1013.
- Cushen, M. et al., 2012. Nanotechnologies in the food industry - Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science and Technology*, 24(1), pp.30–46.
- Dash, M. et al., 2011. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), pp.981–1014.
- Domokos-Szabolcsy, E. et al., 2012. Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in *Nicotinia tabacum*. *Plant Growth Regulation*, 68(3), pp.525–531.
- Dudonne, S. et al., 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH , ABTS , FRAP. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp.1768–1774.

- Dumont, E. et al., 2006. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? *Food Chemistry*, 95(4), pp.684–692.
- Dwyer, D.J. et al., 2012. Antibiotic-Induced Bacterial Cell Death Exhibits Physiological and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. *Molecular Cell*, 46(5), pp.561–572.
- Echegoyen, Y. & Nerín, C., 2013. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical Toxicology*, 62, pp.16–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.014>.
- El-Ramady, H.R. et al., 2014. Selenium and nano-selenium in agroecosystems. *Environmental Chemistry Letters*, pp.495–510.
- Estevez, H. et al., 2014. Effects of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: Comparison with other selenospecies. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 122C, pp.184–193.
- Fabricius, A.L. et al., 2014. ICP-MS-based characterization of inorganic nanoparticles-sample preparation and off-line fractionation strategies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(2), pp.467–479.
- Farrell, H.M. et al., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *Journal of dairy science*, 87(6), pp.1641–1674.
- Finley, J.W. & Penland, J.G., 1998. Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: Clinical and psychological findings. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 11(1), pp.11–27.
- Forootanfar, H. et al., 2014. Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 28(1), pp.75–9.

- Francesconi, K. a. & Pannier, F., 2004. Selenium metabolites in urine: A critical overview of past work and current status. *Clinical Chemistry*, 50(12), pp.2240–2253.
- Galano, E. et al., 2013. Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 12, pp.2196–204.
- Gammelgaard, B. et al., 2002. Selenium speciation in urine by ion-pairing chromatography with perfluorinated carboxylic acids and ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17(6), pp.570–575.
- Gao, F. et al., 2014. Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles. *Biomaterials*, 35(31), pp.8854–66.
- Garti, N. et al., 2005. Nano-sized self-assemblies of nonionic surfactants as solubilization reservoirs and microreactors for food systems. *Soft Matter*, 1(3), p.206.
- Geng, J., Chiron, C. & Combrisson, J., 2014. Rapid and specific enumeration of viable *Bifidobacteria* in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study. *International Dairy Journal*, 37(1), pp.1–4.
- Gigault, J., Nguyen, T.M., et al., 2014. Accurate determination of the size distribution for polydisperse, cationic metallic nanomaterials by asymmetric-flow field flow fractionation. *Journal of Nanoparticle Research*, 16.
- Gigault, J., Pettibone, J.M., et al., 2014. Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: a tutorial. *Analytica chimica acta*, 809, pp.9–24.
- Gigault, J. & Hackley, V. a, 2013. Observation of size-independent effects in nanoparticle retention behavior during asymmetric-flow field-flow fractionation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(19), pp.6251–8.

- Gladyshev, V.N. et al., 1998. A New Human Selenium-containing Protein. *The Journal of biological chemistry*, 273(15), pp.8910–8915.
- Golubkina, N. a., Folmanis, G.E. & Tananaev, I.G., 2012. Comparative evaluation of selenium accumulation by allium species after foliar application of selenium nanoparticles, sodium selenite and sodium selenate. *Doklady Biological Sciences*, 444(1), pp.176–179.
- Di Gregorio, S., Lampis, S. & Vallini, G., 2005. Selenite precipitation by a rhizospheric strain of *Stenotrophomonas* sp. isolated from the root system of *Astragalus bisulcatus*: A biotechnological perspective. *Environment International*, 31(2), pp.233–241.
- Gu, Q.P. et al., 2000. Selenoprotein W accumulates primarily in primate skeletal muscle, heart, brain and tongue. *Molecular and cellular biochemistry*, 204(1-2), pp.49–56.
- Hagendorfer, H., Kaegi, R. & Parlinska, M., 2012. Characterization of Silver Nanoparticle Products Using Asymmetric Flow Field Flow Fractionation with a Multidetector Approach – a Comparison to Transmission Electron Microscopy and Batch Dynamic Light Scattering. *Analytical ...*, 84, pp.2678–2685.
- Hao, P. et al., 2011. Complete sequencing and pan-genomic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reveal its genetic basis for industrial yogurt production. *PLoS ONE*, 6(1).
- Hart, D.J. et al., 2011. Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*, 126(4), pp.1771–1778.
- Hatfield, D.L. & Berry, M.J., 2003. *Its Molecular Biology and Role in Health* Second Edi., New York: Springer Science + Business Media, LLC.

- Herrera, J.E. & Sakulchaicharoen, N., 2009. Microscopic and Spectroscopic Characterization of Nanoparticles. In *Nanoparticulate Drug Delivery Systems (NPDDS) -II: Formulation and Characterization*. pp. 237–249.
- Hoffmann, P.R., 2007. Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(5), pp.289–297.
- Hoque, M.E. et al., 2012. Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow field flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1233, pp.109–115.
- Horibata, Y. & Hirabayashi, Y., 2007. Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase1. *Journal of lipid research*, 48(3), pp.503–508.
- Horowitz, M. et al., 1994. Primary hyperparathyroidism. *Clinics in geriatric medicine*, 10(4), pp.757–775.
- Hu, B. et al., 2008. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(16), pp.7451–7458.
- Hu, Y. et al., 2010. Selenium-enriched milk proteins and selenium yeast affect selenoprotein activity and expression differently in mouse colon. *The British journal of nutrition*, 104(1), pp.17–23.
- Huang, B. et al., 2003. Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(7), pp.805–813.
- Huang, Y. et al., 2013. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*, 34(29), pp.7106–16.
- Hussain, S.M. et al., 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*, 19(7), pp.975–983.

- Iang, Q.I.N.G.L., 2007. Enriched Selenium and Its Effects on Growth and Biochemical Composition in *Lactobacillus bulgaricus*. , pp.2413–2417.
- Intawongse, M. & Dean, J.R., 2006. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 25(9), pp.876–886.
- J.R. Liu, M.J. Chen, C.W.L., 2005. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk – Kefir and Soymilk – Kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), pp.2467–2474.
- Jablonska, E. et al., 2008. Lung cancer risk associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15 polymorphism. *European Journal of Nutrition*, 47(1), pp.47–54.
- Jiang, J., Oberdörster, G. & Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, pp.77–89.
- Joshi, M., Bhattacharyya, a. & Ali, S.W., 2008. Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 33(3), pp.304–317.
- Khan, M. a K. & Wang, F., 2009. Reversible dissolution of glutathione-mediated HgSexS 1-x nanoparticles and possible significance in Hg-Se antagonism. *Chemical Research in Toxicology*, 22(11), pp.1827–1832.
- Köhrle, J., 2000. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 57(13-14), pp.1853–1863.
- Könczöl, M. et al., 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: Role of ROS, JNK, and NF-κB. *Chemical Research in Toxicology*, 24(9), pp.1460–1475.

- Kong, L. et al., 2011. The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis. *Biomaterials*, 32(27), pp.6515–22.
- Kramer, M. et al., 2009. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), pp.1137–1147.
- Kumaraswamy, E. et al., 2000. Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene: Possible role of the protein in cancer etiology. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), pp.35540–35547.
- Laborda, F. et al., 2011. Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(7), p.1362.
- Li, J. et al., 2012. Sodium selenosulfate at an innocuous dose markedly prevents cisplatin-induced gastrointestinal toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(3), pp.376–383.
- Li, Q. et al., 2010. Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by l-cysteine. *Materials Letters*, 64(5), pp.614–617.
- Li, Y. et al., 2011. The reversal of cisplatin-induced nephrotoxicity by selenium nanoparticles functionalized with 11-mercapto-1-undecanol by inhibition of ROS-mediated apoptosis. *Biomaterials*, 32(34), pp.9068–9076.
- Linsinger, T.P.J. et al., 2013. Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food. *Food chemistry*, 138(2-3), pp.1959–66.
- Liu, J. & Rozovsky, S., 2013. Contribution of selenocysteine to the peroxidase activity of selenoprotein s. *Biochemistry*, 52(33), pp.5514–5516.

- Liu, K. et al., 2011. Selenium accumulation in protein fractions during germination of Se-enriched brown rice and molecular weights distribution of Se-containing proteins. *Food Chemistry*, 127(4), pp.1526–1531.
- Lopez Heras, I., Palomo, M. & Madrid, Y., 2011a. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(6), pp.1717–1727.
- Lopez Heras, I., Palomo, M. & Madrid, Y., 2011b. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(6), pp.1717–27.
- Lopez-Heras, I. et al., 2014. Effect of Chitosan-Stabilized Selenium Nanoparticles on Cell Cycle Arrest and Invasiveness in Hepatocarcinoma Cells Revealed by Quantitative Proteomics. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology Executive*, 5(5).
- López-Heras, I., Madrid, Y. & Cámara, C., 2014. Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 124, pp.71–78.
- Luo, Y. et al., 2011. Encapsulation of selenium in chitosan nanoparticles improves selenium availability and protects cells from selenium-induced DNA damage response. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(12), pp.1137–1142.
- Luque-Garcia, J.L. et al., 2013. Bioanalytical strategies for in-vitro and in-vivo evaluation of the toxicity induced by metallic nanoparticles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, pp.254–268.
- Ma, X. et al., 2014. Corrigendum to “Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation” [Sci. Total Environ. 408 (2010) 3053-3061]. *Science of the Total Environment*, 481(1), p.635.

- Matsumoto, K., 1997. Phosphatidylserine synthase from bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1348(1-2), pp.214–227.
- M-M, P. et al., 2014. Flow field-flow fractionation for particle size characterization of selenium nanoparticles incubated in gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 57, pp.203–209.
- Montes-Bayón, M. et al., 2002. Initial studies of selenium speciation in Brassica juncea by LC with ICPMS and ES-MS detection: An approach for phytoremediation studies. *Analytical Chemistry*, 74(1), pp.107–113.
- Montoro Bustos, A.R., Ruiz Encinar, J. & Sanz-Medel, A., 2013. Mass spectrometry for the characterisation of nanoparticles. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(17), pp.5637–43.
- Von Moos, N. & Slaveykova, V.I., 2014. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae--state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology*, 8(January), pp.605–630.
- Mounicou, S. et al., 2009. A sequential extraction procedure for an insight into selenium speciation in garlic. *Talanta*, 77(5), pp.1877–1882.
- Mrvčić, J. et al., 2012. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(9), pp.2771–82.
- Narayanan, K.B. & Sakthivel, N., 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1-2), pp.1–13.
- National Research Council, 2000. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *Medicine*, p.800.
- Navarro-Alarcon, M. & Cabrera-Vique, C., 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment*, 400(1-3), pp.115–141.

- Negro, R., 2008. Selenium and thyroid autoimmunity. *Biologics: Targets and Therapy*, 2(2), pp.265–273.
- Ou, B. et al., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), pp.3122–3128.
- Pace, H.E., Leshner, E.K. & Ranville, J.F., 2010. Influence of stability on the acute toxicity of CdSe/ZnS nanocrystals to daphnia magna. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), pp.1338–1344.
- Palomo, M. et al., 2014. Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt. *Food chemistry*, 164, pp.371–9.
- Palomo-Siguero, M. et al., 2014. Accumulation and biotransformation of chitosan-modified selenium nanoparticles in exposed Radish (*Raphanus sativus*). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.
- Panee, J. et al., 2007. Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp.23759–23765.
- Parlamento Europeo, 2006. Reglamento (CE) No 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo del 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, pp.9–25.
- Peachey, E. et al., 2009. Capabilities of mixed-mode liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the simultaneous speciation analysis of inorganic and organically-bound selenium. *Journal of Chromatography A*, 1216(42), pp.7001–7006.

- Pedrero, Z. & Madrid, Y., 2009. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, 634(2), pp.135–152.
- Peng, D. et al., 2007. Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *Journal of inorganic biochemistry*, 101(10), pp.1457–1463.
- Pettibone, J.M., Gigault, J. & Hackley, V. a., 2013. Discriminating the states of matter in metallic nanoparticle transformations: What are we missing? *ACS Nano*, 7(3), pp.2491–2499.
- Pezo, D., Salafranca, J. & Nerín, C., 2008. Determination of the antioxidant capacity of active food packagings by in situ gas-phase hydroxyl radical generation and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1178(1-2), pp.126–133.
- Pieniz, S. et al., 2014. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37, pp.251–256.
- Press, E.B. & Tappel, a L., 1982. A selenocysteine-containing s e l e n i u m - t r a n s p o r t protein in rat plasma. , 719, pp.147–153.
- Priego-Capote, F. & Luque De Castro, M.D., 2004. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(9), pp.644–653.
- Prior, R.L. et al., 2003. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC)) of Plasma and Other Biological and Food Samples Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORA. , pp.0–6.
- Raevskaya, A.E. et al., 2008. Annealing-induced structural transformation of gelatin-capped Se nanoparticles. *Solid State Communications*, 145(5-6), pp.288–292.

- Raghupathi, K.R., Koodali, R.T. & Manna, A.C., 2011. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 27, pp.4020–4028.
- Ramos, K. et al., 2014. Characterization and quantification of silver nanoparticles in nutraceuticals and beverages by asymmetric flow field flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1371, pp.227–236.
- Rao, Y. et al., 2010. Mapping of selenium metabolic pathway in yeast by liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 82(19), pp.8121–8130.
- Rappel, C. & Schaumlöffel, D., 2008. The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390(2), pp.605–15.
- Rault, A. et al., 2007. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, 55(1), pp.35–43.
- Rayman, M.P., 2012. Selenium and human health. *The Lancet*, 379(9822), pp.1256–1268. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9).
- Rayman, M.P., 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 64(4), pp.527–542.
- Rayman, M.P., 2009. Selenoproteins and human health: Insights from epidemiological data. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(11), pp.1533–1540.
- Rayman, M.P., 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356(9225), pp.233–241.
- Rebolj, K., Pahovnik, D. & Zagar, E., 2012. Characterization of a protein conjugate using an asymmetrical-flow field-flow fractionation and a size-exclusion

- chromatography with multi-detection system. *Analytical chemistry*, 84(17), pp.7374–83.
- Ren, Y. et al., 2013. Antitumor activity of hyaluronic acid-selenium nanoparticles in Heps tumor mice models. *International journal of biological macromolecules*, 57, pp.57–62.
- Reyes, L.H. et al., 2006. Selenium bioaccessibility assessment in selenized yeast after “in vitro” gastrointestinal digestion using two-dimensional chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1110(1-2), pp.108–116.
- Rezvanfar, M.A. et al., 2013. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicology and applied pharmacology*, 266(3), pp.356–65.
- Roberge, M.T., Borgerding, A.J. & Finley, J.W., 2003. Speciation of selenium compounds from high selenium broccoli is affected by the extracting solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), pp.4191–4197.
- Roman, M., Jitaru, P. & Barbante, C., 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(1), pp.25–54.
- Roy, M.K. et al., 2010. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International journal of food sciences and nutrition*, 61(2), pp.109–124.
- Runyon, J.R. et al., 2013. Characterization of oat proteins and aggregates using asymmetric flow field-flow fractionation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(21), pp.6649–6655.
- Sánchez-Martínez, M. et al., 2015. Preparation and Characterization of a Laboratory Scale Selenomethionine-Enriched Bread. Selenium Bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), pp.120–127.

- Sanvicens, N. & Marco, M.P., 2008. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology*, 26(Figure 2), pp.425–433.
- Scharpf, M. et al., 2007. Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. *Journal of Neural Transmission*, 114(7), pp.877–884.
- Schuike, I. & Daum, G., 2009. Phosphatidylserine decarboxylases, key enzymes of lipid metabolism. *IUBMB Life*, 61(February), pp.151–162.
- Seppälä, A. et al., 2014. Selenium supplementation by addition of sodium selenate with silage additive. , (March), pp.81–88.
- Shakibaie, M. et al., 2014. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*.
- Sinha, V.R. et al., 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceutics*, 274(1-2), pp.1–33.
- Soleimani, M., Aflatouni, F. & Khani, a., 2013. A new and simple method for sulfur nanoparticles synthesis. *Colloid Journal*, 75(1), pp.112–116.
- Squires, J.E. & Berry, M.J., 2008. Eukaryotic selenoprotein synthesis: Mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors. *IUBMB Life*, 60(4), pp.232–235.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. , 36.
- Stroyuk, A.L. et al., 2008. Structural and optical characterization of colloidal Se nanoparticles prepared via the acidic decomposition of sodium selenosulfate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 320(1-3), pp.169–174.

- Sun, D. et al., 2014. Inhibition of tumor growth and vasculature and fluorescence imaging using functionalized ruthenium-thiol protected selenium nanoparticles. *Biomaterials*, 35(5), pp.1572–83.
- Tapiero, H., Townsend, D.M. & Tew, K.D., 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57(3), pp.134–144.
- Tiede, K. et al., 2010. Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge. , pp.1149–1154.
- Tirez, K. et al., 2000. Characterization of inorganic selenium species by ion chromatography with ICP-MS detection in microbial-treated industrial waste water. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15(9), pp.1087–1092.
- Torres, S.K. et al., 2012. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 14.
- Tuoriniemi, J., Cornelis, G. & Hassellöv, M., 2012. Size discrimination and detection capabilities of single-particle ICPMS for environmental analysis of silver nanoparticles. *Analytical chemistry*, 84(9), pp.3965–72.
- Ulrich, a. et al., 2012. Critical aspects of sample handling for direct nanoparticle analysis and analytical challenges using asymmetric field flow fractionation in a multi-detector approach. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(7), p.1120.
- Unrine, J.M., Jackson, B.P. & Hopkins, W. a., 2007. Selenomethionine biotransformation and incorporation into proteins along a simulated terrestrial food chain. *Environmental Science and Technology*, 41(10), pp.3601–3606.
- Valcarcel, M. & Ríos, a., 1992. La calidad en los laboratorios analíticos.
- Vekariya, K.K., Kaur, J. & Tikoo, K., 2012. ER α signaling imparts chemotherapeutic selectivity to selenium nanoparticles in breast cancer. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 8(7), pp.1125–32.

- Vijayaraghavan, K. & Yun, Y.S., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26(3), pp.266–291.
- Wang, H., Zhang, J. & Yu, H., 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(10), pp.1524–1533.
- Wang, M. et al., 2007. Quantitative Analysis of Proteins via Sulfur Determination by HPLC Coupled to Isotope Dilution ICPMS with a Hexapole Collision Cell. , 79(23), pp.9128–9134.
- Wang, X. et al., 2014. Efficacy and safety of selenium nanoparticles administered intraperitoneally for the prevention of growth of cancer cells in the peritoneal cavity. *Free radical biology & medicine*, 72, pp.1–10.
- Whanger, P.D., 2004. Selenium and its relationship to cancer: an update. *The British journal of nutrition*, 91(1), pp.11–28.
- Wiecinski, P.N. et al., 2009. Gastrointestinal biodurability of engineered nanoparticles: Development of an in vitro assay. *Nanotoxicology*, 3(September), pp.202–214.
- Wood, S.M. et al., 1999. β -Carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Integrative Medicine*, 2(2-3), pp.85–92.
- Xia, S.K., Chen, L. & Liang, J.Q., 2007. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(6), pp.2413–2417.
- Xia, Y.-Y., 2007a. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of silk fibroin. *Materials Letters*, 61(21), pp.4321–4324.
- Xia, Y.-Y., 2007b. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of silk fibroin. *Materials Letters*, 61(21), pp.4321–4324.

- Xu, J. & Hu, Q., 2004. Effect of Foliar Application of Selenium on the Antioxidant Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Selenium-Enriched Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), pp.1759–1763.
- Yamashita, Y. & Yamashita, M., 2010. Identification of a novel selenium-containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of bluefin tuna. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), pp.18134–18138.
- Yang, L. et al., 2004. Comparison of extraction methods for quantitation of methionine and selenomethionine in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1055(1-2), pp.177–184.
- Yazdi, M.H. et al., 2013. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 21(1), p.33.
- Ye, D., Dawson, K. a & Lynch, I., 2014. A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. *The Analyst*, 140(1), pp.83–97.
- Yu, M.W. et al., 1999. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *American journal of epidemiology*, 150(4), pp.367–374.
- Zeleny, R. & Schimmel, H., 2012. Influence of the approach to calibration on the accuracy and the traceability of certified values in certified reference materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33(2), pp.107–116.
- Zhang, B. et al., 2009. Accumulation and species distribution of selenium in Se-enriched bacterial cells of the *Bifidobacterium animalis* 01. *Food Chemistry*, 115(2), pp.727–734.

- Zhang, J. & Spallholz, J.E., 2009. Toxicity of Selenium Compounds and Nano-Selenium Particles. *General, Applied and Systems Toxicology*, pp.1–15.
- Zhang, J.S. et al., 2001. Biological effects of a nano red elemental selenium. *BioFactors (Oxford, England)*, 15(1), pp.27–38.
- Zhang, L., Li, D. & Gao, P., 2012. Expulsion of selenium/protein nanoparticles through vesicle-like structures by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic environment. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(12), pp.3381–6.
- Zheng, W. et al., 2014. Multifunctional polyamidoamine (PAMAM) modified selenium nanoparticles dual-delivering siRNA and cisplatin to A549/DDP cells for reversal multidrug resistance. *Acta biomaterialia*.
- Zimmerman, M.T. et al., 2015. Sulfur and selenium antioxidants: Challenging radical scavenging mechanisms and developing structure–activity relationships based on metal binding. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 145, pp.30–40.
- Zotta, T. et al., 2012. A comparison of fluorescent stains for the assessment of viability and metabolic activity of lactic acid bacteria. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(3), pp.919–27.

Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.

Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes

III.OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Los objetivos principales de la investigación recogida en la presente memoria están orientados a la síntesis y caracterización de SeNPs, y su aplicación a la industria alimentaria con dos enfoques:

- Desarrollo de alimentos enriquecidos en selenio (basados en procesos de fermentación láctica y vegetales). Para ello se realizará un estudio completo de la acumulación, biotransformación y potencial toxicidad de las SeNPs en bacterias lácticas (*Lactobacillus Bulgaricus*) y rábanos (*Raphanus Sativus*)
- Desarrollo de envases multicapa flexibles con capacidad antioxidante mediante la incorporación de las SeNPs en el adhesivo. Para ello, se llevará a cabo la evaluación de la capacidad antioxidante y la posible migración de las SeNPs desde el envase al contenido.

Para conseguir estos objetivos generales se proponen los siguientes objetivos concretos:

1) **Síntesis y caracterización de nanopartículas de Selenio.** La síntesis se realizará empleando distintos agentes estabilizantes (polimeros y tensioactivos no iónicos) compatibles con la industria alimentaria. La caracterización de las SeNPs obtenidas, en relación con tamaño y morfología, se llevará a cabo mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) y fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico (AF⁴) acoplada a UV-VIS e ICPMS.

2) **Acumulación, biotransformación y toxicidad de SeNPs en bacterias lácticas y plantas.** El estudio supondrá el desarrollo de una metodología analítica que implica una gran variedad de técnicas como la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS) y el HPLC-ICPMS para la determinación de selenio total y sus especies, respectivamente; la citometría de flujo con distintos ensayos para establecer la viabilidad, y por último la microscopia de transmisión electrónica para

evaluar la internalización de las SeNPs. Los resultados obtenidos se compararán con los proporcionados con el selenito sódico que es la forma habitual de suplementar selenio.

3) **Desarrollo de nuevos envases alimentarios** basados en la tecnología multilaminar **e incorporación de nanopartículas de selenio como agentes antioxidantes**. En este punto, los trabajos realizados se centrarán en evaluar la capacidad antioxidante de distintos materiales con nanopartículas de selenio como material activo y la capacidad de migración de dichas nanopartículas del envase al alimento.

4) Paralelamente a los diferentes trabajos de investigación plasmados en esta memoria, uno de los objetivos más importantes ha sido la formación profesional y personal continuada mediante la realización de otras actividades científicas que se recogen a continuación:

4.1 Realización de revisiones bibliográficas enfocadas a profundizar en el estudio de las selenoproteínas.

4.2 Desarrollo de trabajos de investigación complementarios enfocados en la cuantificación y especiación de selenio en muestras de ensilajes enriquecidas en presencia de seleniato sódico.

4.3 Supervisión de la investigación de estudiantes y participación de forma activa en actividades docente del Departamento de Química Analítica.

4.4 Realización de 8 artículos publicados o en fase de publicación y presentación de 5 comunicaciones (tanto orales como en forma de poster) en congresos tanto nacionales como internacionales.

**Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.
Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes**

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo I.

Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Selenio

El descubrimiento de las propiedades singulares de las nanopartículas, respecto a partículas de mayor tamaño con la misma composición, está revolucionando el mundo de la ciencia y la tecnología, abriendo camino a aplicaciones hasta ahora impensables. La mayor reactividad de las NPs está principalmente influenciada por su elevada relación área superficial/volumen, y por la presencia de numerosos defectos superficiales y sitios catalíticamente activos, características que hacen que la reactividad de las NPs sea aproximadamente 1000 veces superior respecto a las micropartículas o materiales “bulk”. Además, esta reactividad puede modificarse mediante el recubrimiento o la funcionalización de su superficie. Todo esto hace que las NPs posean una elevada actividad biológica, ofreciendo unas interesantes aplicaciones en muchos sectores, uno de ellos el de la alimentación tanto humana como animal. Algunas de las aplicaciones de las NPs en este sector son el desarrollo de envases alimentarios con propiedades antimicrobianas o antioxidantes, encapsulación de nutrientes, desarrollo de suplementos alimenticios, utilización como aditivos.

Como se ha puesto de manifiesto en la Introducción de esta Tesis, la correcta caracterización de las NPs no es una tarea fácil y requiere la utilización de técnicas muy diversas. Por otra parte, la aplicabilidad de las NPs supone una evaluación previa de su

toxicidad. Los procesos de acumulación y biotransformación de NPs en sistemas biológicos pueden alterar las NPs y modificar su toxicidad.

En el trabajo (**“Effect of capping agents on size and morphology on selenium nanoparticles: Analytical characterisation by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Transmission Electron Microscopy”**. *Analytica Chimica Acta (Enviado)*) se ha realizado la caracterización por tamaño, morfología y composición de las SeNPs sintetizadas mediante la reducción de selenito sódico con ácido ascórbico en presencia de diferentes agentes estabilizantes (polímeros y tensioactivos no iónicos), así como la optimización de distintos parámetros de la síntesis (concentración de agente estabilizante, relación de agente reductor/ Na_2SeO_3 y pH). Las SeNPs obtenidas fueron estables y de geometría esférica (excepto en el caso de luminol que se obtuvieron nanohilos), con un diámetro de tamaño de partícula siempre inferior a 100nm. En este trabajo, se puso de manifiesto como el tamaño de las SeNPs queda determinado por las condiciones de síntesis y características del agente estabilizante, obteniéndose tamaños de NPs mayores al aumentar la concentración del mismo. Los agentes estabilizantes fueron seleccionados en base a ser compuestos habituales y permitidos en la industria alimentaria.

La caracterización de las SeNPs se realizó mediante la técnica de fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico (AF⁴) acoplada al UV-VIS e ICPMS. Durante el desarrollo de esta metodología se optimizaron diferentes variables experimentales como: el caudal del flujo perpendicular “*cross flow*”, tiempo de inyección/focalización, composición de la fase móvil, tipo de membrana y espesor de la membrana. Los parámetros se optimizaron en función de la resolución de la separación y de la recuperación, con el objeto de minimizar las interacciones NPs-membrana. La determinación del tamaño de las SeNPs se llevó a cabo mediante la calibración del sistema con nanopartículas de látex de tamaño controlado. Los resultados obtenidos, tras la aplicación del método de calibración propuesto, se validaron mediante la comparación con los tamaños de SeNPs obtenidos mediante TEM, no existiendo diferencias significativas entre los resultados proporcionados por

ambas técnicas, debido fundamentalmente a que las SeNPs presentan una morfología esférica no agregada.

**I.1. Efecto del Agente Estabilizante en el tamaño y morfología de SeNPs:
Caracterización Analítica mediante Fraccionamiento de Flujo
con Campo de Flujo Aplicado (AF⁴) acoplado a ICPMS y
Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)**

“Effect of Capping Agents on Size and Morphology on Selenium
Nanoparticles: Analytical Characterisation by Asymmetrical Flow Field
Flow Fractionation coupled to Inductively Coupled Plasma Mass
Spectrometry and Transmission Electron Microscopy”

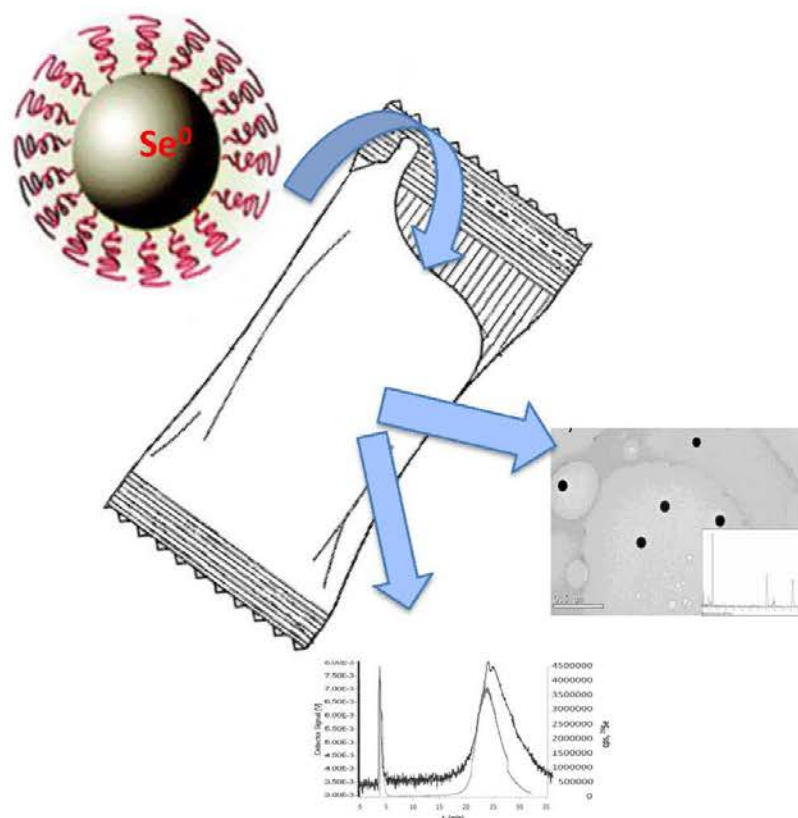
Analytica Chimica Acta (*Enviado*)

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química” Úbeda, España, Junio 2013. Tipo
de Presentación: Comunicación Oral

“(Bio)Analytical Strategies for Speciation and Ecotoxicity Studies – Fall School” Madrid,
España, Mayo 2014. Tipo de presentación: Póster.

*Graphical Abstract



Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles as active material for new antioxidant packaging

*Manuscript (including figures, tables, text graphics and associated captions)

[Click here to view linked References](#)

**Effect of Capping Agents on Size and Morphology on Selenium Nanoparticles:
Analytical Characterisation by Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation
coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Transmission
Electron Microscopy**

María Palomo-Siguero¹, Yolanda Madrid¹, Paula Vera², Yolanda Echegoyen², Cristina
Nerin² and Carmen Cámara^{1*}

¹Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad
Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.

²Departamento de Química Analítica. I3A. EINA. Universidad de Zaragoza. 50018
Zaragoza. Spain.

*Corresponding author. Tel.: +34 91 394 43 18.

E-mail address: ccamara@qui.ucm.es (C. Cámara)

ABSTRACT

Selenium nanoparticles (Se NPs) have antioxidant properties. Thus, they can be good candidates for being incorporated into antioxidant active packaging materials to extend the shelf life of food. However the critical point is the introduction of stable SeNPs in the packaging materials.

This paper evaluates the synthesis and characteristics of selenium nanoparticles formed by reducing sodium selenite with ascorbic acid in presence of different stabilizing agents such as polysaccharides (Chitosan (Poly(D-glucosamine)) and Hydroxyethyl cellulose (HEC)) and non-ionic surfactants (Triton X-100 (*t*-octylphenoxypolyethoxyethanol), 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate, and Isotridecanol ethoxylate), to determine which are the most adequate synthesis conditions for further use as additives for food packaging. Several parameters such as pH, reducing agent, and stabilisers were optimised.

Selenium nanoparticles obtained using Chitosan, HEC, Triton X100, and 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate were stable and spherical within a range size of (20-40), (≈ 100), (18-40) and (28-60) nm, respectively. The use of isotridecanol ethoxylate as stabilizer agent produced nanorods morphology. Their size and aggregation were characterized by Transmission Electronic Microscopy (TEM) and by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF⁴) coupled to DAD-UV and ICPMS detectors. This work demonstrates that the size of selenium nanoparticles is determined by the synthesis conditions and the type of stabiliser. Selenium nanoparticles obtained with *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol and 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate are compatible with the type of incorporation to be used, to increase the antioxidant capability of multilayer food packaging.

Keywords: Selenium nanoparticles, synthesis, antioxidant, Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, Transmission electronic microscopy

1. Introduction

Nanotechnology is a new and fast emerging field that involves the characterization, preparation, and/or manipulation of nanostructures, devices or materials that contain components with at least one dimension of approximately 1-100 nm in length.

Because of the high surface to area ratio of nanoparticles per mass unit, they are expected to be more biologically active than large sized particles of the same chemical composition, offering important features for food applications [1].

Several potential uses of nanotechnology in various segments of the food industry have been identified, such as agriculture (e.g., release of pesticides and fertilizers; animal and plant pathogen detection), food processing (e.g., nanoencapsulation of food flavors or aroma compounds; gelation and viscosifying agents), food packaging (e.g., UV protection, high barrier increase to gases, antimicrobials,...), and dietary supplements (e.g., mineral and vitamin fortification), with packaging being one of the most important applications in the food area [2].

Besides preserving food from oxygen, light, pathogenic microorganisms, etc., food packages have many other functions, and their characteristics may affect the shelf life of food [3]. Polymers are quite frequently used for these purposes, due to their advantages over conventional materials (e.g., metal, ceramic (glass), and paper). Polypropylene (PP), polyethylene (HDPE, LDPE...), polyethylene terephthalate (PET), and polyvinyl chloride (PVC) are the most widely used. Unfortunately there is not a

single polymer with the required high barrier properties for most of food packaging and consequently the combination of several materials in multilayer structures is the common practice. These multilayers, and often multimaterial packages, require adhesives to glue the different layers. Thus, adhesives take part of the final packaging materials and should be considered as part of them.

Another approach to improve the barrier properties of polymers is the incorporation of nanoparticles (NPs) (e.g., silicate NPs, silver NPs, nanocomposites) into the food packaging material. NPs can also be applied as reactive particles to respond to environmental changes, degradation products, or contamination by microorganisms [4]. Chemical characteristics and properties of NPs depend on the type of nanoparticles and the physicochemical composition that forms the shell of these nanoparticles.

Different types of metallic nanoparticles, such as silver and TiO_2 NPs, incorporated into food contact polymers to enhance mechanical and barrier properties, have been proposed [5 - 7] but all of them are in direct contact with the food. According to the EU legislation [8] the use of NPs in direct contact with food is only permitted for Titanium nitride. Se NPs act as antioxidant agents and so they could be used in indirect contact in food packaging. The additional advantage of Se versus other NPs is the demonstrated healthy properties for consumers, as this element takes part of food supplements worldwide. However, to produce a new antioxidant packaging material with Se NPs involve the synthesis and stabilization of the NPs, their incorporation into the packaging and the demonstration of the efficiency as antioxidant packaging. Thus, the development of antioxidant and antimicrobial nanoparticles, such as SeNPs, for their inclusion in food packaging to increase and ensure the preservation of the packaged food, may have a great potential.

This paper deals with the first part of the research and describes the synthesis, characterization and stabilization of Se NPs, which will be later included into a multilayer food packaging to extend the shelf life of food.

Nano-sized particles need to be characterized in terms of size, chemical composition, distribution, shape, and agglomeration grade. Transmission electron microscopy (TEM) is one of the most popular tools to identify and characterize NPs size, allowing a resolution of 0.1 nm (high resolution TEM), and providing two-dimensional information about nanoparticle dispersion, structure, and shape. For the chemical analysis, the energy dispersive X-ray analysis (XEDS) incorporated to TEM provides the localization of elements in a semiquantitative manner⁹. Moreover, the Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF⁴) separation technique, coupled to DAD/UV and ICP-MS detectors post-optimization provides complementary information to TEM results.

Thus, controlled sizes Se NPs were synthesized using different capping agents in presence of various stabilizing agents, and the control of diverse factors of the synthesis process (concentration of the stabilizing-agent, ascorbic acid-selenite ratio, and pH value). To obtain Se NPs compatible with the food packaging, the synthesis was performed in presence of either a polysaccharide, (e.g., chitosan, a Poly(D-glucosamine), hydroxyethyl cellulose (HEC)) and/or an ethoxylated non-ionic surfactant (Triton X-100 (*t*-octylphenoxypolyethoxy-ethanol), 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate and isotridecanol ethoxylate). The main purpose of this paper is to evaluate how pH, type and concentration of reducing agent and stabilizers may affect the NP size, stability and properties for their use in adhesives, which will be later employed to built multilayer materials for food packaging.

2. Material and methods

2.1 Instrumentation

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Agilent HP7700x, USA), fitted with a Meinhard nebulizer and an impact bead quartz spray chamber was used to determine selenium concentration under the conditions shown in Table 1.

The morphological characteristics of the NPs were examined using a high resolution Transmission Electron Microscope (TEM) (JEOL JEM 2000 and 2100, USA) equipped with an X-Ray Energy Dispersive Spectroscopy (XEDS) microanalysis composition system (Oxford Inca, city). An asymmetrical flow Field-Flow fractionation (AF⁴) AF2000 system (Postnova Analytik, Landsberg, Germany), equipped with a regenerated cellulose membrane of 10 kDa molecular weight cut-off and a spacer of 500 μm , was used in this study.

The efficiency of Se NPs formation was assessed by controlling the percentage of ionic selenium that was not converted into NPs. Thus, ionic selenium was separated by ultra-centrifugation (Eppendorf centrifuge 5804 F34-6-38) using 10 kDa molecular weight cut-off filters (Millipore, Ann Arbor, MI)) [6, 7]. Ionic selenium in the filtrate was measured by ICPMS (Mod HP7700x, Agilent, USA). Dialysis process using membranes of 3.5 kDa molecular weight cut-off filters (Thermo, USA) was also used as an alternative method.

2.2 Standards and reagents

All reagents were of analytical grade. The stabilizing agents used for the synthesis were Chitosan, a polysaccharide derived from shrimp shells (340g·mol⁻¹ MW and $\geq 75\%$ deacetylation degree); the following non-ionic surfactants: Triton X-100

from Fluka, 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate from Sigma, and iso-tridecanol ethoxylate (Sasol, South Africa) and a polymer such as Hydroxyethyl cellulose from Sigma. Ascorbic acid and sodium selenite were obtained from Sigma-Aldrich. Acetic acid was purchased from Scharlab. Chitosan solutions of different concentrations were prepared by dissolving chitosan in 3% (w/v) acetic acid solution and shaking the mixture until a transparent solution was obtained. The stabilizing agents were diluted with MilliQ water to achieve the desired concentrations. All solutions were filtered through 0.45 nm nylon filters. An acrylic adhesive was used as vehicle to incorporate the Se NPs into the multilayer packaging. The formula is under patent protection PCT/ES2006/000311.

2.3 Procedures

2.3.1 Synthesis of selenium nanoparticles.

A reduction process of sodium selenite to form Se NPs was evaluated. The mechanism is based on the reaction between a stabilizing agent (chitosan (poly(D-glucosamine)), Triton X-100 (*t*-octylphenoxypolyethoxyethanol), 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate, and iso-tridecanol ethoxylate) mixed with the reducing agent (ascorbic acid in this case) with sodium selenite. First, the solution containing the stabilizing agent was dropwise mixed with the reducing agent and stirred for 30 minutes at room temperature using magnetic agitation. Next, the selenite solution (from 100 to 1000 mgL⁻¹) was slowly added to the above solution and stirred for 30 min at room temperature. Different stabilizing agents/ascorbic acid and ascorbic acid/Na₂SeO₃ precursor weight ratio were tested.

2.3.2 Analysis of selenium nanoparticles by TEM/AF⁴-DAD-ICPMS.

The morphological characteristics of the nanoparticles were examined using a high-resolution Transmission Electron Microscope (TEM) (JEOL JEM 2100, USA). One drop of the diluted NP suspension was placed with a syringe on a carbon film on 300 mesh copper grid. An Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF⁴) AF2000 system (Postnova Analytik, Landsberg, Germany), equipped with a regenerated cellulose membrane of 10 kDa molecular weight cut-off and a spacer of 500 µm, was used in this study. A loop of 200 µL was employed to inject the samples into the AF⁴ via a Rheodyne valve. The AF⁴ channel was connected on-line to a DAD detector (JASCO, Japan) and to an ICPMS. The optimized AF⁴ settings and flows used for the separations, and the DAD and ICPMS detection operating conditions are detailed in Table 1. The calibration for molecular diameter size determination was performed using a mixture of polystyrene standard latex (22, 58 and 100nm).

2.3.3 Efficiency of the selenium nanoparticles synthesis.

Encapsulation efficiency (EE) was defined, in other studies, as the drug content entrapped in the nanoparticles [9]. In our case it is referred to the percentage of the total selenium added that is effectively transformed into nanoparticles and calculated as follows:

$$\% \text{ Efficiency of NP formation} = \frac{\text{Selenium}_{\text{total}} - \text{Selenium}_{\text{free}}}{\text{Selenium}_{\text{total}}} \cdot 100$$

Where total Selenium was the amount added as selenite and the Selenium free was the amount obtained in the filtrate after ultra-centrifugation of the suspension containing the Se NPs with a 10kDa molecular weight cut-off (Millipore, Ann Arbor, MI) [10, 11]. Ultracentrifugation was carried out (Eppendorf centrifuge 5804 F34-6-38) at 4000 g for 30min at room temperature. NPs remained in the membrane [12] and the

content of ionic Selenium (Selenium free) in the filtrate was measured by ICPMS after acid digestion.

The dialysis was performed during 24 h at room temperature against Milli-Q water using dialysis membranes with a molecular mass cut-off of 3.5 kDa. The milli-Q water used in the dialysis process was changed twice over the 24 hours of the experiment. After this process, Se NPs remained in the membrane and were quantified as selenium after acid digestion under the experimental conditions shown in Table 1.

2.3.4 Determination of Total Selenium.

An aliquot of 500 μ L of the Se NPs suspension was digested with 500 μ L of concentrated HNO_3 (Merck) and 250 μ L of 30% hydrogen peroxide (Panreac) in double-walled advanced composite vessels (ACV), using a 1000 W microwave sample preparation (MS) microwave oven (CEM, Mattheus, NC). The resulting solution was diluted with deionized water and the concentration of selenium was determined by ICP-MS. The results are expressed as the mean value (standard deviation for n 3).

3. Results and discussion

3.1 Selection of stabilizing agent

The first generation of NPs was based on an ionic gelation technique between protonated $-\text{NH}_3^+$ in chitosan (CS) and negatively charged groups of ascorbic acid. The capping of Se NPs with chitosan occurs through an electrostatic interaction between the protonated form of $-\text{CH}-\text{NH}_3^+$ and ascorbic acid, which results in surface charge reduction [13]. Several reports have documented the mucoadhesive properties [14, 15] of CS due to molecular attractive forces caused by positively charged CS and negatively

charged mucosal surfaces. For this reason, chitosan was initially selected to act as capping agent for Se NPs.

In addition, CS-based materials are interesting, because CS is a polysaccharide with natural antimicrobial properties, adding an antimicrobial effect to the antioxidant effect of Se NPs [16]. Furthermore, CS films loaded with Ag NPs have also been found to have better gas barrier properties than virgin films [17, 18] and polymers containing Ag NPs have been reported in the literature and are already present in the market.

A second generation of Se NPs capped with non-ionic surfactants was prepared using a procedure similar to the one described above.

Non-ionic surfactants have several advantages over polysaccharides [19] for the stabilization of NPs: high hydrophobicity, formation of stable emulsions, low toxicity [20, 21], and lower media pH sensitivity. However, these compounds are more sensitive to temperature changes [13]. Thus, all the experiments were carried out at room temperature.

Non-ionic surfactants are adsorbed to NP surfaces by either a hydrophilic or a hydrophobic group oriented towards the surface. The adsorption process depends on the polarity of the surface. The presence of polar groups capable of H-bonding with the hydrophilic group of the surface surfactant will orient the hydrophilic group of the surfactant towards the core of the NP, making the surface more hydrophobic. If the NP surface has not such hydrophilic groups, the surfactant will make the NP more hydrophilic [21].

Thus, several ethoxylated non-ionic surfactants (Triton X-100 (*t*-Octylphenoxypolyethoxyethanol), 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate, Isotridecanol ethoxylate and Hydroxyethyl cellulose at different Se NPs stabilization

concentrations were evaluated. Figure 1 shows the chemical structure of the different stabilizing agents under test.

3.1.1 Effect of the stabilizing agent concentration.

The concentration of the stabilizing agent in the Se NPs was modified from 0.01 to 0.5% (w/v). The different tested stabilizers led to morphological differences in Se NPs as can be seen in the TEM images in Figure 2. Se NPs generated in the presence of poly(D-glucosamine) (Chitosan), *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol, and 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate are spherical and they do not form aggregates. Their diameter ranged between 18-55 nm. In contrast, Se NPs generated from iso-tridecanol ethoxylate had a non-spherical morphology (nano rods with variable thickness and a length of $4.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$) as shown in Figure 2. Variations in diameter size with the stabilizer concentration are not shown in the images. The chemical analysis by XEDS incorporated to TEM demonstrated the only presence of selenium in the nanoparticles.

Figure 3A shows the effect of surfactant concentration on Se NP size. NP size grows linearly with increasing stabilizer concentration in all tested cases, except for the NPs generated with iso-tridecanol ethoxylate for which it was not possible to determine the size growth because of the morphology of the nano-rods. The particle size of the generated NPs was below 100 nm; NPs coated with 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate had the largest diameter ($\approx 55\text{nm}$).

In order to avoid the use of surfactant a third experiment for Se NPs synthesis was tested with Hydroxyethyl cellulose (HEC) as stabilizer agent. Two concentrations 0.1 and 0.5% of HEC were used to stabilize Se NPs. A change in concentration of HEC (from 0.1 to 0.5 %) did not affect the yield of the Se NPs synthesis but significantly

affected their size. Two groups of Se NPs were observed: $5 \pm 2\text{nm}$ and $110 \pm 9\text{ nm}$ using 0.1% HEC. However, using a 0.5 % HEC only one size of Se NPs of 110 nm was obtained. In both cases, Se NPs with a size over 100 nm presented a spherical and non-aggregated geometry. This increase of Se NPs size could be due to the presence of more alcoholic groups than those existing with the other stabilizing agents under test.

It is worth mentioning that NPs with smaller size offer larger relative surface for the same concentration of selenium than bigger NPs. Then, small NPs imply the presence of higher number of Se NPs, and so a higher possible beneficial effect. This is an important point for the final application into the packaging material, where both the number and surface of Se NPs will play a critical role.

The efficiency of NPs formation was evaluated for all generated Se NPs, using increasing concentrations of the stabilizing agent. The results showed (Figure 3B) an efficiency over 90% with concentrations equal or higher than $\approx 0.1\%$. Repeatability of the final Se NPs solution was also evaluated, with values higher than 95%, what emphasizes the robustness of the procedure.

3.1.2 Effect of ascorbic acid.

The effect of several concentrations of the reducing agent (0.027 M (half the concentration of selenite), 0.054M (equal to the concentration of selenite), 0.108 M (twice the concentration of selenite), 0.27 M (five times the concentration of selenite) and 0.34 M (6.3 times the concentration of selenite) on the size of the resulting NPs was studied.

It was found that the size of nanoparticles increases with decreasing the concentration of the reducing agent, what could be attributed to possible interactions between the hydrophobic and non-hydrophobic surfactant chains. From concentrations

higher than 0.05%, the size of the Se NPs remained constant. The efficiency (%) of Se NPs formation was in all cases $\geq 90\%$, except for 0.027 M ascorbic acid (half the concentration of selenium), at which only part of selenium was reduced to elemental selenium.

CS-NPs had a more pronounced effect on Se NP size in comparison to the other surfactants. This could be attributed to the presence of amino and diol groups in CS, while the other surfactants only have alcohol groups (1 alcohol group in the case of *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol and a diol group in the case of 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate). A concentration of 0.1 % was chosen for further experiments.

3.1.3 The effect of pH.

Several pHs (from 3 to 10) were tested to assess their effect on Se NPs size using a 1:1 reducing agent: selenium concentration ratio.

The effect of pH on Se NPs size was almost negligible, except for chitosan (Figure 3C) due to Se NPs aggregation. Aggregation may be attributed to the isoelectric point (6.2) of CS. Thus, the spherical morphology of Se NPs generated at $\text{pH} \geq 6$ is lost (Figure 4) and an irreversible flocculation process takes place.

Thus, one of the most remarkable advantages of using non-ionic surfactants is that they can be used within a higher pH range without affecting the characteristics of the NPs (including their size), which is of great relevance if they are going to be use in food packaging. If the vehicle to incorporate the Se NPs into the packaging would have an anionic character, aggregation followed by flocculation of stabilized Se NPs with the cationic polysaccharide (Chitosan) will occur, which should be avoided. In contrast, the use of Se NPs coated with a non-ionic surfactant, not only allows the use of these NPs

in a wide interval of pHs, but also their further stability is guaranteed. For this reason, Se NPs synthesis in the presence of Chitosan polysaccharide was discarded for further application with adhesives to be used in laminates of multilayer packaging.

Different pHs, within the range 4 to 9, Se NPs dispersions with *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol, 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate, Isotridecanol ethoxylate and Hydroxy ethylcellulose in contact with the adhesive formula were tested. The size of Se NPs was evaluated by TEM analysis and no morphological changes were observed. Moreover, no flocculation processes took place when mixed with the adhesive. Thus, any of the above synthesized Se NPs are suitable for further application in food packaging.

3.2 Characterization of Se NPs by AF⁴-DAD-ICPMS

A method based on AF⁴ was optimized for the characterization of Se NPs, due to their spherical morphology (a relevant feature when using this method). AF⁴ is a single-phase chromatographic technique in which the separation is achieved within a very thin channel, against which a perpendicular force field is applied by a cross flow. The flow and sample are confined within a channel that consists of two plates separated by a spacer. Within the flow channel, a parabolic flow profile is created. As a result, the stream moves slowly closer to the boundary edges than it does at the center of the channel flow. When a perpendicular force field is applied, the particles are driven toward the boundary layer of the channel [22].

The coupling of AF⁴-ICP-MS lowered the detection limit (LOD) to determine Se NPs by more than three orders of magnitude in comparison to other detector systems such as Dynamic Light Scattering (DLS) or Multiangle Light Scattering (MALS), allowing the unequivocal identification of NPs.

Figure 5C shows the fractogram obtained after injecting 200 μL of the Se NPs suspension (0.5% 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate, 0.054 M ascorbic acid, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Se, pH 5.0) using a constant cross-flow of 2 mL/min for the first 2min, a linear gradient 2–0 mL for the subsequent 20 min, and then 0 mL/min for the last 10 min. The DAD-UV detector was set at 369 nm, the maximum absorption wavelength for Se NPs. It is important to mention that the molecular spectra is only due to Se NPs as other compounds initially in the sample do not reach the detector after applying the AF⁴ separation technique. The fractogram in Figure 5C shows a Se NPs peak at a retention time of 25 min. This peak was identified as selenium by ICPMS.

The cross-flow rate was optimized by performing test runs at constant cross-flow rates of 1, 2, 3, and 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, using a spacer (channel thickness) of 250 nm. High Se NPs retention in the membrane retention was detected using the most promising conditions (4 mL/min) for Se NPs separation of different sizes, as recovery obtained under these conditions was about 35%. To improve the separation of the NPs the spacer was modified to 500 nm, which has the same effect as multiplying four times the cross-flow, whereas if the cross-flow is high it will lead to sample dilution, which causes an increase in the interaction with the membrane. The cross-flow was then optimized by a linear gradient (2–0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

The optimal experimental parameters are shown in Table 1; the separation capability was calibrated using a mixture of polystyrene standard latex (PSL) (Figure 6), as no Se NPs standards are commercially available for calibration. PSL have demonstrated to be useful for Se NPs characterization [23, 24]. It was recently demonstrated that for both polymeric and inorganic NPs the core composition has a significant influence on the retention time, an influence not described in the classical

FFF equation, which demonstrates the importance of selecting the appropriate calibration material [25].

Gigault et al. [23] showed that the retention times of NPs with different sizes are affected by the properties of the nanomaterial. Thus, the fractograms of NPs of 100 nm of Se, Au, Ag, and PSL showed different retention times for each type of NPs. They observed an increase of the retention time with the core density of the NPs, moreover a peak shape change was observed. This indicates that the retention time increases for nominally size-matched metallic NPs in comparison with lower density. PSL and Se NPs did not show differences in term of retention time for the same particle size. For this reason, AF⁴ calibration for Se NPs was carried out by PSL, in absence of Se NPs commercially available. A linear dependence was found between particle size and retention time for PSL (Figure 6).

To confirm these results, a Se NPs suspension (0.5% 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate, 0.054 M ascorbic acid, 10 µg·mL⁻¹ Se, pH 5.0) characterized by TEM and with a particle size of 53 nm was injected into the system. The detection was performed by coupling the AF4 to a DAD-UV and ICPMS (using a reaction cell to prevent selenium interferences) (Figure 5C). The results (59 ± 4 nm) were in line with those obtained by TEM (53 ± 6 nm).

Recovery (R (%)), defined as the ratio between the recovered mass post-analysis, m , and the initial injected mass, m_o , was used to assess the performance of the fractionation method, i.e., the ability of the method (instrument components + procedure and experimental conditions) to fractionate analytes without a substantial loss of the material or information. The quantification is based on integration of each fractogram peak after the sample is injected with and without the cross-field via an on-line approach [23].

$$R(\%) = (m/m_0) \times 100$$

In the case of the Se NPs suspension with a composition of 0.5% 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate (0.054 M ascorbic acid, 10 ug·mL⁻¹ Se, pH 5.0) the recovery was set at $R(\%) \approx 91 \pm 1$. Thus, we can assume that standards of latex can be successfully used to calibrate the system for Se NPs characterization.

Once the optimization of SeNPs separation by AF⁴-UV-ICPMS was performed, the analysis of the others SeNPs synthesized with the different stabilizer agents (Chitosan (Fig.3A), Triton X-100 (Fig.3B) and HEC (Fig.3D)), was carried out. To determine the particle size, an aliquot of the dispersion was injected into the system using the operating conditions shown in Table 1. As for NPs coated with 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate, the results were in line with those obtained by TEM. The particle size obtained by AF⁴ was: SeNPs-CS (26±3nm) (TEM 25±5nm), SeNPs-TritonX100 (22±3nm) (TEM 23±3nm) and SeNPs-HEC (91±8nm) (TEM 101±6nm).

3.3. Incorporation of NPs into the packaging

The NPs dispersion was incorporated into the packaging material using an adhesive as vehicle. Several acrylic water-base adhesives were explored and both were initially compatible. The final dispersion was homogeneous and did not show apparent problems. Adhesivity was successfully checked. Maximum concentration of the NPs dispersion was also evaluated to maintain the adhesive properties. The adhesive formula, developed in this case for laminates in which plastic-plastic was glued, is under Patent (PCT/ES2006/000311). Thus, the formula cannot be revealed here. Both adhesives were compatible with all the dispersions previously optimized containing NPs. After preparation the adhesives were left for one month. Precipitation of NPs was

observed. After shaking the NPs dispersion was achieved in a homogenous way and adhesives could be used again. The behavior of the adhesive after one month was the same as that recently prepared, what confirms the stability of the adhesive.

4. Conclusions

The formation of Se NPs with nano-metric sizes can be controlled by varying key processing conditions, such as the concentration and the chemical composition of the stabilizing agent, the ascorbic acid/ Na_2SeO_3 precursor ratio, and the pH. Here, we showed that Se NPs larger in size are achieved by increasing the concentration of the stabilizer. pH and chitosan (ionic stabilizer) concentration also had a remarkable influence on the stability of the NPs. The use of non-ionic surfactants in the synthesis of Se NPs provided stable and spherical nanoparticles in almost all cases. The behavior of these NPs was similar to those obtained with Chitosan, except for the differences due to flocculation and aggregation processes with pH modifications. Both types of NPs, those synthesized using non ionic surfactants and hydroxyethyl cellulose, were not aggregated when mixing with the adhesive. These aspects are important from a stability perspective and incorporation into food packaging.

In this study flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS has been shown as appropriate to separate, detect, and quantify nanoparticles. However, there are still challenges to overcome, both in AF^4 and in ICP-MS, such as poor recovery, which can be partly attributed to the nanoparticles sticking to the AF^4 membrane and not being eluted into the detection system.

Determination of the antioxidant capacity of both the Se NPs and the new packaging material containing them will be further evaluated. This work will be included in a second part of this paper.

Acknowledgements

Authors wish to thank the financial support from the Ministry of Economy and Competitiveness (Spain) (Project IPT-2012-0261-420000 and CTQ2011-28328-C02-C01), the Community of Madrid/ FEDER programe (S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM), the European Project ORQUE SUDOE SOE3/P2/F591 and to Samtack Industrial Adhesives (Barcelona).

References

- [1] N. Sozer, J.L. Kokini, Nanotechnology and its applications in the food sector, *Trends. Biotechnol.* 27 (2009) 82-89.
- [2] Q. Chaudhry, M. Scotter, J. Blackburn, B. Ross, A. Boxall, R. Castle, R. Aitken, R. Watkins, Nanotechnologies in food, *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 241-258.
- [3] TV. Duncan, Applications of Technology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors, *J. Colloid. Interf. Sci.* 363 (2011) 1-24.
- [4] H. Bouwmeester, S. Dekkers, MY. Noordam, W. Hagens, AS. Bulder, C. Heer, S. Voorde, S. Wijnhoven, H. Marvin, Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production, *Regul. Toxicol. Pharm.* 53 (2009) 52-62.
- [5] Y.Echegoyen, C. Nerin, Nanoparticle release from nano-silver antimicrobials food containers, *Food Chem. Toxicol.* 62 (2013) 16-22 .
- [6] M. Avella, J.J. De Vlieger, M.E. Erric, S. Fischer, P. Vacca, M.G. Volpe, Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications, *Food Chem.* 93 (2005) 467-474.

- [7] Y.C. Ke, Y.G. Wang, L. Yang, Improving the hydrophobic, water barrier and crystallization properties of poly(ethylene terephthalate) by incorporating monodisperse SiO₂ particles, *Polym. Int.* 59 (2010) 1350-1359.
- [8] Regulation 10/2011/EU Union Guidelines on Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food
- [9] S. Shah, A. Pal, V.K. Kaushik, S. Devi, Preparation and characterization of venlafaxine hydrochloride-loaded chitosan nanoparticles and *in vitro* release of drug, *J. Appl. Polym. Sci.* 112 (2009) 2876-2887.
- [10] B. Hu, C. Pan, Y. Sun, Z. Hou, H. Ye, B. Hu, X. Zeng, Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins, *J. Agricultural Food Chemistry* 56 (2008) 7451-7458.
- [11] J. Liu, S. Yu, Y. Yin, J. Chao, Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles, *Trends Anal. Chem.* 33 (2012) 95-106.
- [12] A. Llorens, E. Lloret, P.A. Picouet, R. Trbojevič, A. Fernandez, Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging, *Trends Food Sci. Technol.* 24 (2012) 19-29.
- [13] Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron, Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of Chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids surf. B* 44 (2005) 65-73.
- [14] V.R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kunria, Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *Int. J. Pharm.* 274 (2004) 1-33.
- [15] S. Kockisch, G.D. Röss, S.A. Young, J. Tsibouklis, J.D. Smart, Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: An *in vitro* evaluation of mucoadhesive potential, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 1614-1623.
- [16] Zhang, Y. Luo, H. Zeng, Q. Wang, F. Tian, J. Song, W.H. Cheng, Encapsulation of selenium in Chitosan nanoparticles improves selenium availability and protects cells from selenium-induced DNA damage response, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 1137-1142.

- [17] R. Yoksan, S. Chirachanchai, Silver nanoparticle-loaded chitosan-starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties, *Mater. Sci. Eng.* 30 (2010) 891.
- [18] J.W. Rhim, S.I. Hong, H.M. Park, P.K.W. Ng, Preparation and characterization of Chitosan-based nanocomposite films with antimicrobials activity, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5814-5822.
- [19] M. Soleimani, F. Aflatouni, A. Khani, A new and simple method for sulphur nanoparticles synthesis, *Colloid J.* 75 (2013) 112–116.
- [20] E.J. Acosta, The HLD-NAC equation of state for microemulsions formulated with noionic alcohol ethoxylate surfactants, *Colloids Surf. A* 320 (2008) 193–204.
- [21] M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Second Ed., John Wiley and Sons, New York, 1989.
- [22] D. Mitrano, J. Ranville, K. Neubauer, R. Thomas, Analysis of protein from nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 irradiated by X-ray using Raman spectroscopy, *Spectroscopy* 27 (2012) 1-7.
- [23] J. Gigault, V. Hackley, Observation of size-independent effects in nanoparticle retention behavior during asymmetric-flow field-flow fractionation, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 6251–6258.
- [24] M. Palomo-Siguero, M.I. López-Heras, C. Cámara, Y. Madrid, Accumulation and biotransformation of chitosan-modified selenium nanoparticles in exposed radish (*Raphanus sativus*), *J. Anal. At. Spectrom.* (2015) Advance Article.

Figure Captions

Figure1. Stabilizing agents: a) Poly(D-glucosamine) (Chitosan), b) *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X100), c) 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate, d) Isotridecanol ethoxylate and e) Hydroxyethyl cellulose.

Figure2. TEM images and XEDS spectrum of Se NPs solutions at pH 5, $T=20\pm1$ °C, 0.1% stabilizing agent, 0.054M ascorbic acid, $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Se. a) (D-glucosamine) (Chitosan), b) *t*-octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X100), c) 2,4,7,9-tetramethyl 5 decyne-4,7-diol ethoxylate, d) iso-tridecanol ethoxylate and e) Hydroxy ethylcellulose.

Figure 3. 3A)Effect of the stabilizing agent on Se NPs particle size. $T=20\pm1$ °C, pH 5.0, 0.054M ascorbic acid, $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Se. 3B) Effect of non-ionic surfactants on Se NPs formation efficiency (%). $T=20\pm1$ °C, pH 5.0, 0.054M ascorbic acid, $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Se. 3C) Effect of Ascorbic acid on particle size. $T=20\pm1$ °C, pH 5.0, 0.1% stabilizing agent, $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Se. 3D) Effect of solution pH on particle size. $T=20\pm1$ °C, 0.1% stabilizing agent, 0.054M ascorbic acid, $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Se.

Figure 4. Effect of pH on morphology and particle size. TEM images of a SeNP suspension at pH 3 (Figure 4a) and 7 (Figure 4b), respectively. $T=20\pm1$ °C, 0.1% Chitosan, 0.054 M ascorbic acid, $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Se.

Figure 5. Fractograms of Se NPs solutions. A) 0.1% Poly(D-glucosamine) (Chitosan), 0.054M Ascorbic acid, $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Se, pH 3.0, b) *t*-

octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X100), c) 0.5% ethoxylated 2,4,7,9-tetramethyl
5decyne-4,7-diol, 0.054 M ascorbic acid, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Se, pH 5.0 and E) 0.5% Hydroxy
ethylcellulose, 0.054M Ascorbic acid, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Se, pH 5.0.

Figure 6. Fractogram of latex standards with molecular sizes of 22, 58, and 100
nm and calibration curve.

Table

Table1. Operating Conditions for AF⁴-DAD-ICPMS

ICPMS parameters	
RF Power (W)	1550
Plasma gas flow rate (L min ⁻¹)	15.0
Ar auxiliary flow rate (L min ⁻¹)	0.30
Carrier gas flow rate (L min ⁻¹)	0.75
Nebulizer	Conikal
Spray Chamber	Scott
Acquisition mode	Continuous
Isotopes monitored	⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se
Replicates	3
Reaction gas	H ₂
Reaction gas (mL H ₂ min ⁻¹)	6
AF ⁴ separation parameters	
Membrane	Cellulose regenerated (10 kDa cut-off filter)
Spacer (nm)	500
Mobile phases	H ₂ O (pH 5.0)
Injection flow (mL min ⁻¹)	0.1
Injection time (min)	2
Cross-flow (mL min ⁻¹)	2
Gradient mode	Linear
Injection volume (μL)	200
Wavelength (nm)	369

Figure

[Click here to download Figure: Figure 1.docx](#)

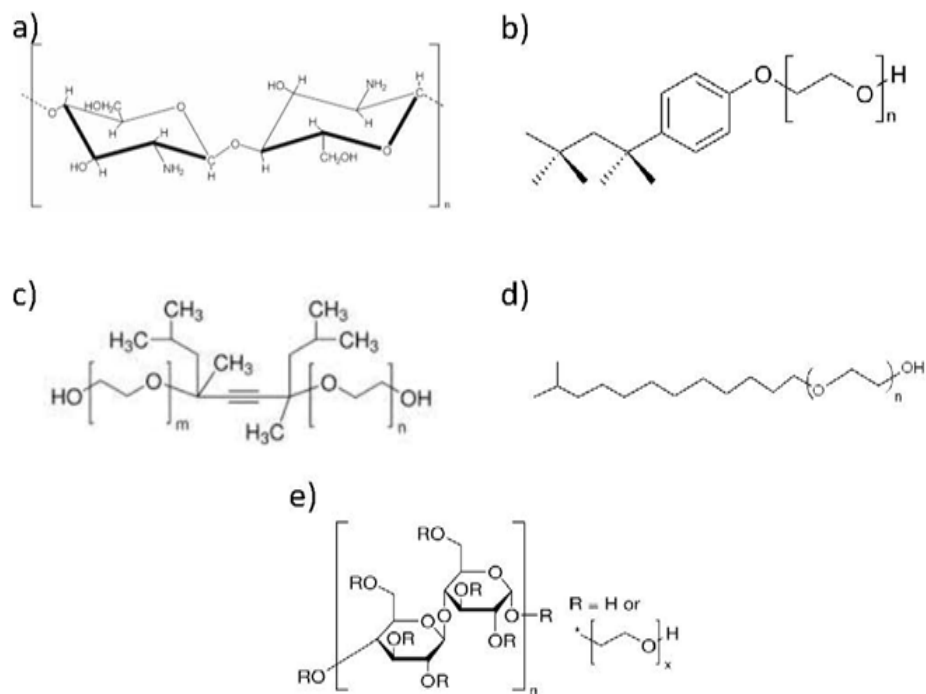


Figure1

Figure 2

[Click here to download Figure: Figure 2.docx](#)

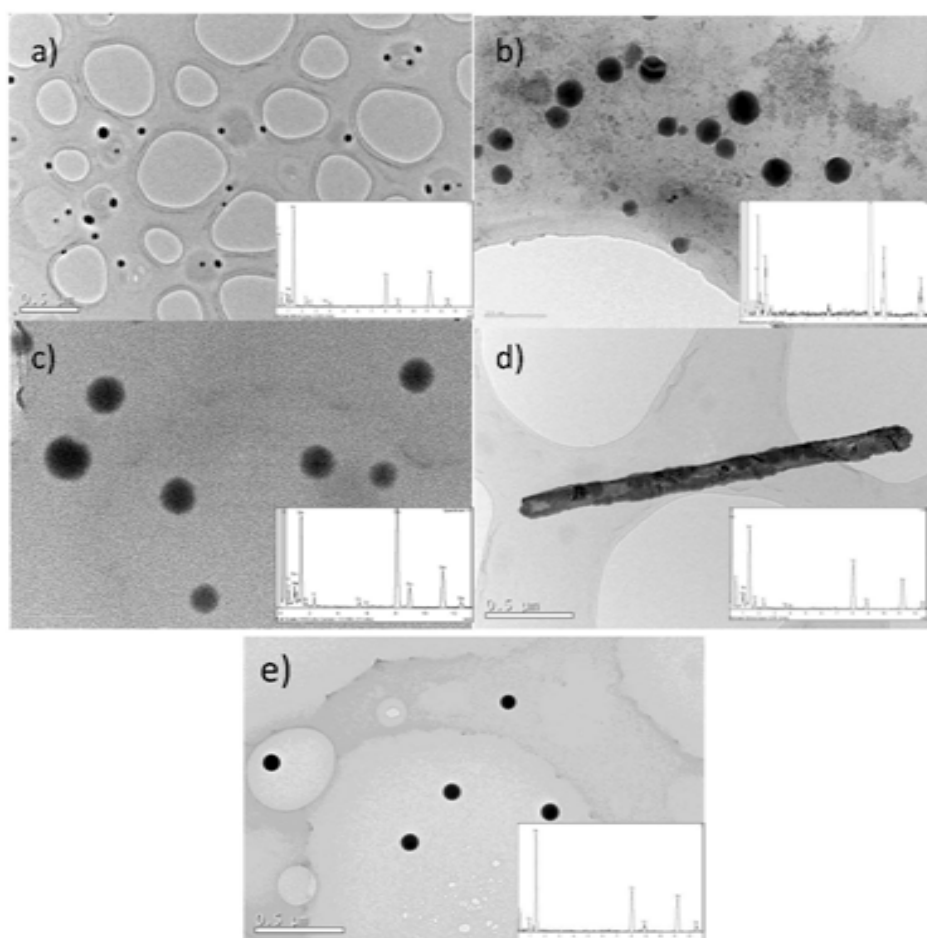


Figure 2

Figure 3

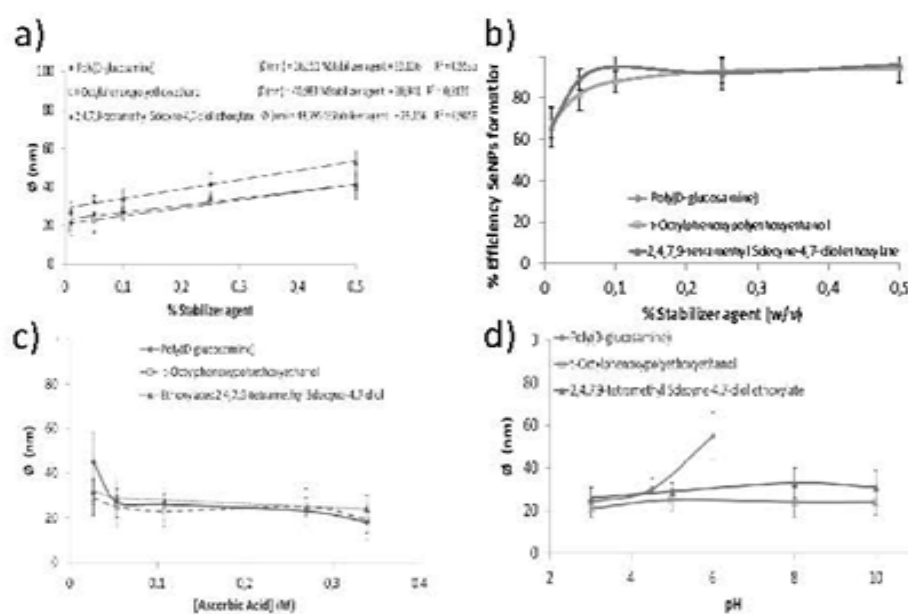
[Click here to download Figure: Figure 3.docx](#)


Figure 3

Figure 4

[Click here to download Figure: Figure 4.docx](#)

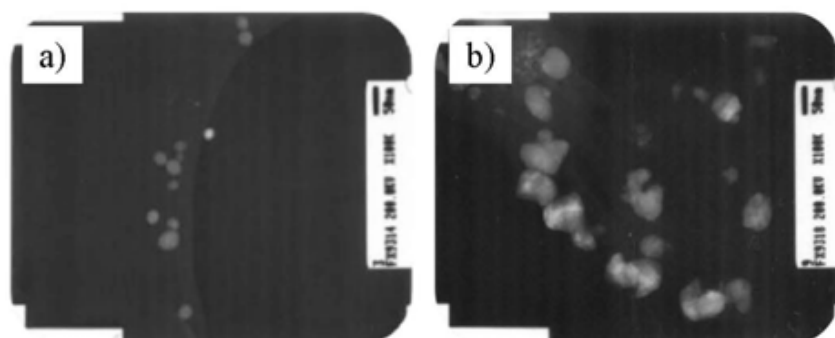


Figure 4

Figure 5

[Click here to download Figure: Figure 5.docx](#)

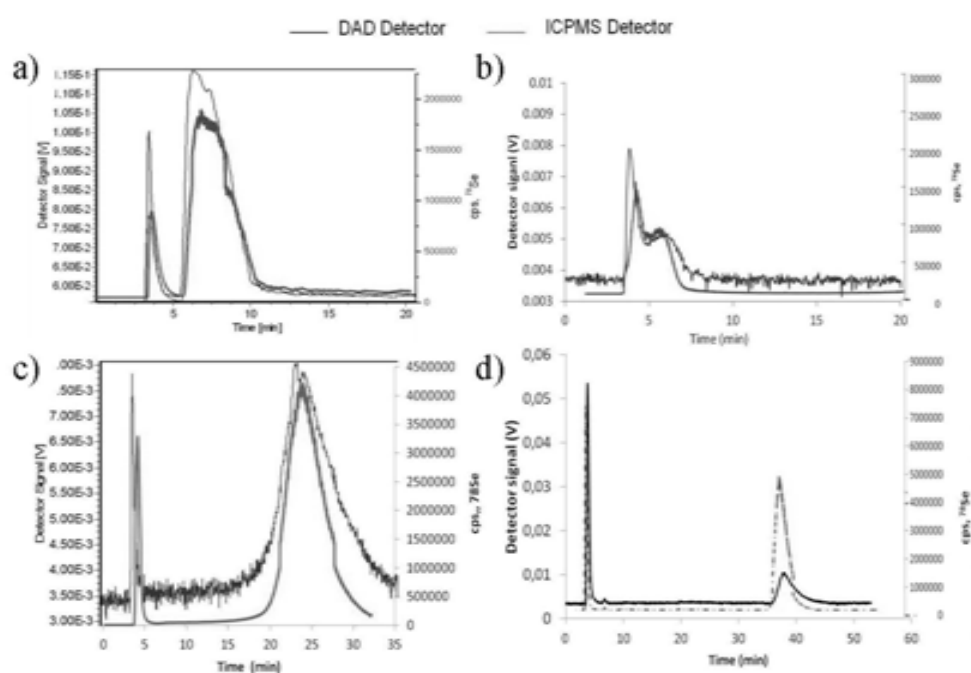


Figure 5

Figure 6

[Click here to download Figure: Figure 6.docx](#)

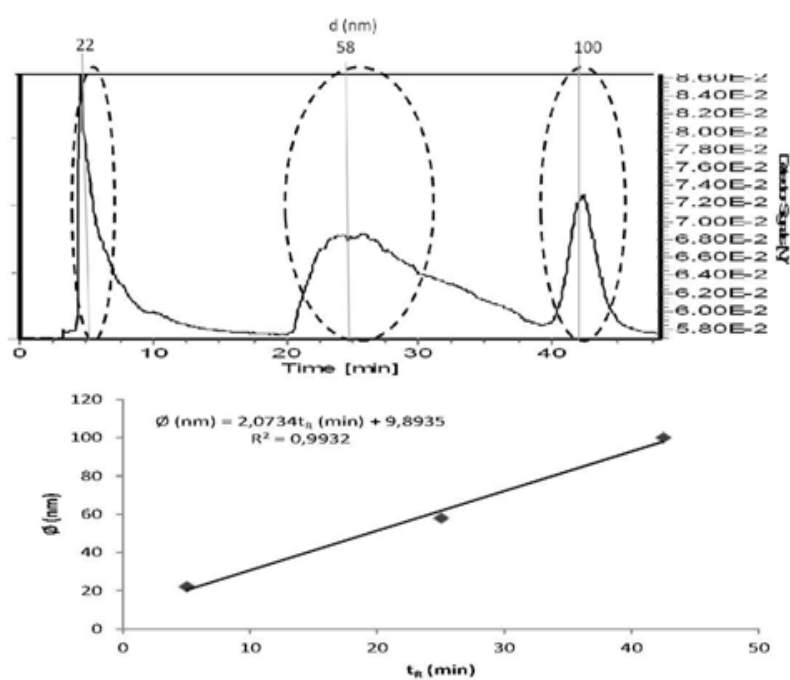


Figure 6

Capítulo II.

Biotransformación y Toxicidad de SeNPs en Bacterias Lácticas y Plantas

El selenio es considerado un micronutriente esencial para humanos y animales, debido principalmente a sus propiedades antioxidantes y a otras funciones biológicas desempeñadas principalmente por las selenoproteínas. Sin embargo, se ha comprobado que este nutriente esencial se encuentra por debajo de los niveles de ingesta adecuados en la población de numerosos países. Por todo esto y, dado que la principal fuente de incorporación de selenio en el organismo es a través de la dieta, una línea de investigación de interés es el desarrollo de alimentos funcionales y suplementos nutricionales enriquecidos con selenio.

Las bacterias ácido lácticas (LAB) tienen una gran presencia en la industria alimentaria, siendo ampliamente empleadas en procesos de fermentación láctica para la preparación de una gran variedad de alimentos. En concreto, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (*L. Bulgaricus*), es una bacteria láctica, que actúa sinérgicamente con *Streptococcus Thermophilus* como iniciadores de cultivos en la manufactura de alimentos producidos en una fermentación láctica (como quesos o yogurt). Ciertas especies de LAB, entre las cuales se encuentran *L. Bulgaricus*,

presentan la capacidad de unir metales en su superficie y transportarlos/almacenarlos en su interior por un complejo proceso que depende de las características del ión del metal, propiedades fisiológicas de las bacterias y características físico-químicas del medio ambiente/cultivo. Se han descrito dos mecanismos para este proceso: bioadsorción (proceso pasivo no metabólico) y bioacumulación (proceso metabólico donde los iones pasan la membrana celular y, se acumulan en el interior celular de manera asociada al crecimiento de la célula). En el caso de las NPs, además de las características/propiedades de los metales involucrados en las mismas, hay que sumar aspectos como el tamaño, la morfología y el estabilizante empleado en la preparación de las mismas.

Las bacterias *L. Bulgaricus* presentan una elevada tolerancia y capacidad de transformar selenio inorgánico en especies orgánicas (selenoamino ácidos), las cuales son más seguras y nutricionalmente más activas. En este capítulo se ha aprovechado la capacidad de *Lactobacillus Bulgaricus* para biotransformar selenio inorgánico a especies de selenio orgánico. Hasta el momento, aunque son muchos los estudios enfocados a evaluar los efectos del selenio en LAB, en la mayoría de los casos las únicas especies de selenio implicadas son las formas inorgánicas (Se(IV) y Se(VI)) y orgánicas como (SeMet, SeCys₂, SeMeSeCys). Las propiedades biológicas de las SeNPs junto a su baja toxicidad podrían ser una buena alternativa para sustituir las formas convencionales de selenio para la preparación de suplementos nutricionales basados en procesos de fermentación láctica.

En los trabajos que se detallan a continuación se recogen los estudios relacionados con la capacidad de las bacterias lácticas de biotransformar el selenio cuando se suplementa en forma de SeNPs y de selenito (este último a efectos comparativos).

En el primer trabajo presentado ("**Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt**"). Food Chemistry, 164 (2014) 371) se expone el estudio llevado a cabo sobre la biotransformación de selenio, suplementado en forma de selenito; e incorporación a proteínas durante el proceso de fermentación láctica para la preparación del yogurt. En el mismo, se demostró la capacidad de LAB para

transformar el selenio, obteniéndose un producto final como es el yogurt enriquecido en seleno aminoácidos. Se evaluó la distribución de Se en la fracción proteica soluble (la cual es más bioaccesible para su asimilación en el organismo humano). Además, la aplicación de la espectrometría de masas y técnicas de proteómica permitió la separación e identificación de proteínas presentes en el Yogurt enriquecido en Se. El resultado mas reseñable de este trabajo es la ausencia de chaperonas (una proteína que se expresa en condiciones de estrés celular) en los yogures enriquecidos en selenio con respecto a los control (preparados en ausencia de selenio). Esto puede indicar que el Se juega un papel clave en la expresión de las mismas, colaborando a disminuir los factores de estrés (temperatura, pH) que puedan afectar a LAB.

Dentro de este capítulo, **se recogen además los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de las SeNPs preparadas con diferentes agentes estabilizantes sobre las bacterias *Lactobacillus Bulgaricus***. Para ello las bacterias se cultivaron en presencia de SeNPs y selenito (este último a efectos comparativos) a dos niveles de exposición 1 y 10 mg Se L⁻¹ y durante 24, 48 y 72 horas de incubación. La realización de estos estudios implicó el desarrollo de metodologías que combinan una gran variedad de técnicas: Técnicas de microscopía electrónica para la localización de las SeNPs en el interior de las bacterias y detección de posibles daños en la estructura de las mismas y las técnicas de ICPMS e HPLC-ICPMS para la cuantificación de la concentración de selenio acumulado por las bacterias y su posible transformación una vez que el selenio ha sido acumulado por la bacteria, respectivamente.

Para la evaluación de la la viabilidad bacteriana tras la exposición de las bacterias a Se(IV) y SeNPs, se empleó la técnica de citometría de flujo empleando distintos marcadores fluorescentes como Syto9 e IP. Así mismo, se realizó el estudio sobre la exposición de fosfatidilserina como marcador apoptótico en *Lactobacillus Bulgaricus*, a través de la marcación mediante Anexina-V usando la técnica de citometría de flujo

El primer paso realizado, se recoge en el trabajo titulado **“Understanding the accumulation, biotransformation and toxicity of selenium nanoparticles in *Lactobacillus Bulgaricus*”, Analyst (Enviado)** donde se evalúan las potenciales ventajas

y capacidad de absorción / acumulación de selenio suplementado en forma SeNPs modificadas con quitosan (CS- SeNPs) con respecto a su suplementación como selenito sódico. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que las bacterias acumulan y biotransforman las CS-SeNPs con más facilidad y rapidez que el selenito. Los principales compuestos orgánicos detectados en las bacterias tratadas con CS-SeNPs fueron SeCys₂ y SeMet, el primero con importantes capacidades antioxidantes. La observación ultramorfológica de las bacterias mediante TEM sugiere que las CS-SeNPs penetran en la bacteria sin ocasionar daños, manteniendo la viabilidad bacteriana (en relación con bacterias que no han sido expuestas). Por el contrario, las bacterias fueron menos tolerantes a la presencia de selenito sódico. El selenito sódico origina daños irreversibles en la membrana bacteriana, disminuyendo la viabilidad (en comparación a bacterias control). Es importante destacar que en aquellas bacterias tratadas con selenito se detectó la presencia de SeNPs sintetizadas biológicamente y como resultado de un mecanismo de destoxificación.

Una vez comprobada la posibilidad de emplear SeNPs como alternativa al selenito sódico para la suplementación de Se en procesos de fermentación láctica, en el siguiente trabajo (**“Evaluation of coating material dependent on toxicity of SeNPs to *L. Bulgaricus*”**, Analytical and bioanalytical chemistry (*Enviado*)) se evaluó el efecto de otras SeNPs sintetizadas con diferentes agentes estabilizantes y por tanto con distintos tamaños. Los agentes estabilizantes ensayados fueron: quitosan, hidroxietil celulosa y un tensioactivo no iónico. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el agente estabilizante ejerce un papel importante sobre la toxicidad de las SeNPs, tema que no es tratado suficientemente en la mayoría de los trabajos relacionado con la toxicidad de las NPs.

Como se ha comentado en el apartado de Introducción de esta Tesis, otra estrategia para incrementar el estatus de selenio en las poblaciones es mediante la biofortificación de cultivos, es decir, la aplicación de fertilizantes enriquecidos en selenio, bien al suelo o de forma foliar. Las plantas, dependiendo entre otros factores de la especie vegetal, son capaces de acumular y transformar selenio. A pesar de que este elemento no ha sido clasificado como un elemento esencial para las plantas, su papel es considerado beneficioso debido a que es capaz de acumularse e incorporarse

en grandes cantidades; estando su distribución en la planta influida con la concentración y la forma química en que se encuentra en el medio de cultivo. Tradicionalmente, los estudios de acumulación y biotransformación de selenio en plantas se han realizado mediante la suplementación de formas inorgánicas de selenio tanto al suelo como a medios hidropónicos. Los resultados han puesto de manifiesto que el selenito, una vez acumulado por la planta, ésta lo biotransforma a selenoamino ácidos, mientras que el seleniato permanece mayoritariamente en su forma original.

En el cuarto trabajo presentado en este capítulo (**“Accumulation and Biotransformation of Chitosan-modified Selenium Nanoparticles in Exposed Radish (*Raphanus Sativus*)”** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 30 (2015) 1237) se recogen los resultados obtenidos en el estudio sobre la incorporación y biotransformación de nanopartículas de selenio estabilizadas con chitosan por plantas de rábanos (*Raphanus Sativus*).

La capacidad de biotransformación de las nanopartículas de selenio, se realizó empleando una metodología analítica la cual combina técnicas cromatográficas de HPLC y fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico (AF⁴) y empleando como detector el ICPMS. Así mismo se realizó el análisis y caracterización de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las razones para seleccionar los rábanos como planta objeto de estudio fueron: son vegetales fáciles de cultivar y de rápido crecimiento, la parte comestible es la raíz, acumulan cantidades apreciables de selenio (cuando se suplementa como selenito) y lo transforman a SeMeSeCys, especie con propiedades anticarcinogénicas. Las plantas fueron cultivadas en medio hidropónico, ya que este tipo de cultivo permite una mayor reproducibilidad de las condiciones de trabajo.

Los análisis mediante HPLC-ICPMS de las plantas de rábanos expuestos a CS-SeNPs demostraron una biotransformación superior al 95% del selenio acumulado. Las especies mayoritarias fueron SelenoMetilSelenoCisteína (SeMeSeCys) y SelenoMetionina (SeMet); resultados similares se obtuvieron tras la suplementación con selenito. Las imágenes obtenidas por TEM de las raíces de las plantas revelaron la presencia de CS-SeNPs en las mismas.

II.1. Metalómica del Selenio durante la Fermentación Láctica de Yogurt Enriquecido en Selenio

“Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt”

Food Chemistry, 164 (2014) 371

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“7th International Franco-Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry”
Gijón, España, Julio 2012. Tipo de presentación: Comunicación oral.

“XXIII Reunión Nacional de Espectroscopía – VII Congreso Ibérico de Espectroscopía”
Córdoba, España, Septiembre 2012. Tipo de presentación: Póster.



Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt



María Palomo, Ana M. Gutiérrez, M. Concepción Pérez-Conde, Carmen Cámara, Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2014

Received in revised form 10 April 2014

Accepted 4 May 2014

Available online 15 May 2014

Keywords:

Selenium

Lactic bacteria

Yogurt

Asymmetric field flow fractionation

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide

gel electrophoresis

Mass spectrometry techniques

ABSTRACT

Selenium biotransformation by lactic acid bacteria during the preparation of Se-enriched yogurt was evaluated. The study focused on the distribution of selenium in the aqueous soluble protein fraction and the detection of selenoamino acids. Screening of selenium in Tris-buffer-urea soluble fraction was carried out by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis after pre-fractionating with asymmetric field flow fractionation using inductively coupled plasma-mass spectrometry as the detector. Selenium-containing fractions were identified by peptide mapping using nano LC-ESI/LTQMS. Proteins such as thioredoxin, glutaredoxin, albumin, β -lactoglobulin, and lactoperoxidase were identified in the selenium-containing fraction. All these proteins were detected in both the control and the selenium-enriched yogurt except chaperones, which were only detected in the control samples. Chaperones are heat-shock proteins expressed in response to elevated temperature or other cellular stresses. Selenium may have an effect on chaperones expression in *Lactobacillus*. For the amino acids analysis, selenocysteine was the primary seleno-containing species.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Selenium (Se) is an essential nutrient with a recommended dietary allowance (RDA) of 55 $\mu\text{g}/\text{d}$ for adults. Improving Se status may benefit long-term health whilst strengthening the immune response (Rayman, 2002). Se deficiency could cause mutations or polymorphisms in selenoprotein genes and synthesis cofactors. Moreover, its deficiency has been associated with a range of diseases, such as muscular and cardiovascular disorders, cancer, and neurological and endocrine function disorders (Goenaga-Infante, Hearn, & Catterick, 2005; Roman et al., 2010).

Selenium can be covalently bound to many compounds and its metabolic function depends on the chemical compound. Se is essential for the function of multiple selenoproteins, including thioredoxin reductase, glutathione peroxidase, iodothyronine deiodinases, selenoprotein P, selenoprotein W, and selenoprotein S. Se is genetically present in selenoproteins at the active site as selenocysteine (SeCys). Unlike selenoproteins, Se-containing proteins include Se as SeMet, which is non-specifically inserted in a protein, substituting methionine; in these later cases, Se does not confer any special characteristics to the proteins (Lopez-Heras, Palomo, & Madrid, 2011).

The dietary considerations of Se have led to a widespread scientific interest regarding the development of Se-enriched food

products (Pedrero, Madrid, & Cámara, 2006; Peñas et al., 2012; Sánchez-Martínez et al., 2012) and dietary supplements (Gosetti et al., 2007; Zembrzuska, Matusiewicz, Polkowska-Motrenko, & Chajduk, 2014).

Lactobacillus can incorporate and biotransform inorganic Se into organic Se compounds (such as selenocysteine) (Alzate, Pérez-Conde, Gutiérrez, & Cámara, 2010; Alzate et al., 2007), which are safer and nutritionally more active. Thus, *Lactobacillus* can be used to prepare Se-enriched dairy products, as an easy way to supply Se to individuals with deficiencies of this element.

Lactic acid bacteria (LAB) have been shown to be useful (Picard et al., 2005; Saxelin, Mattila-Sandholm, & Tand de Mos, 2005; Todorov & De Melo Franco, 2010) as probiotics for humans and animals, with a wide range of physiological effects; LAB produce antimicrobial compounds that contribute to the safety of the final product. Thus, dairy products, e.g., yogurt, seem to be excellent vehicles for delivering Se to individuals with deficiencies of this element.

A better understanding of Se metabolism during fermentation in presence of LAB is necessary to develop more effective Se-enriched dairy products. The presence of selenoamino acids and the distribution of Se in the proteins are determined through Se metabolomic studies and multi-technique methods. The methods based on a combination of liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICPMS) using different chromatographic mechanisms provide information about possible elements binding to different molecules and/or species in

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3945145.

E-mail address: ymadrid@ucm.es (Y. Madrid).

II.2.1. Acumulación, Biotransformación y Toxicidad de Nanopartículas de Selenio en *Lactobacillus Bulgaricus*

“Understanding the accumulation, biotransformation and toxicity of selenium nanoparticles in *Lactobacillus Bulgaricus*”

Food Chemistry (*Enviado*)

***Manuscript**

Click here to view linked References

Understanding the accumulation, biotransformation and toxicity of selenium nanoparticles in *Lactobacillus Bulgaricus*.

María Palomo-Siguero^a, Ana M^a Gutiérrez^a, Concepción Pérez-Conde^a and Yolanda Madrid^{a*}.

^aDepartamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid

Corresponding author. Facultad Ciencias Químicas, Av Complutense s/n, 28040 Madrid, España. Tel.: +(34) (91) 3945145

* E-mail address: ymadrid@ucm.es (Y. Madrid)

1. Introduction

Nanotechnology has enabled researchers to synthesize nanosized particles (that is, particles that have sizes less than 100 nm in at least one dimension) and using them in a wide range of applications. Nanoparticles possess increased surface areas (m^2/g) and therefore have increased interactions with biological targets (such as bacteria) compared with conventional microparticles. As a result, nanoparticles will likely exert stronger effects on bacteria than their micro-counterparts. Lactic acid bacteria (LAB) have been used to ferment or culture foods for at least 4000 years. LAB have health-promoting attributes, including anti-carcinogenic activities, hypocholesterolemic properties and antagonistic actions that can restrain intestinal and food borne pathogens (Pieniz, Andreazza, Anghinoni, Camargo, & Brandelli, 2014). It has been reported (Yang et al, 2009; Iang, 2007; Palomo, Gutiérrez, Pérez-Conde, Cámara, & Madrid, 2014; Alzate, Fernández-Fernández, Pérez-Conde, Gutiérrez, & Cámara, 2008; Alzate et al, 2007; Galano et al, 2013) that the health-promoting benefits of LAB can be enhanced by the presence of selenium. In this line, selenium-enriched probiotics have been shown to strongly inhibit the growth of pathogenic *Escherichia coli* *in vivo* and *in vitro* (Iang, 2007). The presence of low selenium concentration in the culture media also enhances nutritive value of bacterial biomass by elevating the contents of essential elements such as P, Mg, Mn, Zn, Ca, and total amino acids (Yang et al, 2009). Moreover, accumulation and biotransformation of selenium by lactic bacteria have been reported in several papers (Palomo, Gutiérrez, Pérez-Conde, Cámara, & Madrid, 2014; Alzate, Fernández-Fernández, Pérez-Conde, Gutiérrez, & Cámara, 2008; Alzate et al, 2007; Galano et al, 2013), being Selenocysteine (SeCys) and Selenomethionine (SeMet) the main selenium species. In all above-mentioned studies, selenium was supplemented as selenite, however, the effects of elemental selenium nanoparticles (SeNPs) on microorganisms remain largely unknown. SeNPs appears to be more effective than other Se sources like sodium selenite, selenomethionine, and selenomethylselenocysteine in inducing selenoenzymes like glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TRx) and, therefore in preventing oxidative DNA damage through their potent antioxidant activity (Peng, Zhang, Liu, & Taylor, 2007; Luo et al, 2011; El-Ramady et al, 2014). Some researchers have reported the synthesis of selenium nanoparticles and their biological effects toward mammalian cells *in vitro* (Lopez-Heras et al, 2014; Estevez, Garcia-Lidon, Luque-Garcia, & Camara, 2014).

Others reported inhibitory effects of SeNPs on the growth of some types of bacteria as *Streptomyces Aureus* (Tran, & Webster, 2011). According to the existing literature no data about the effect of SeNPs on lactic acid bacteria has been reported so far. One of the most important parameters in assessing toxicity is viability. Loss of membrane integrity of a bacterial cell reflects the absence of reproductive growth and metabolic activity leading to bacteria death. The cell wall Gram-positive LAB constituents consists mainly of peptidoglycans, (lipo)teichoic acids, proteins, and polysaccharides (Sengupta et al, 2013), these compounds possess numerous functional groups with various charge distributions which can selectively bind metal ions. Certain species of lactic acid bacteria (LAB) can bind metal and metalloids to their cells surface or transport and store them inside the cell in a complex process that depends on the characteristics of the element, physiology properties of LAB strain and physico-chemical characteristics of the environment (Mrvčić, Stanzer, Solić, & Stehlik-Tomas, 2012). Two mechanisms seem to be involved: biosorption (a passive no metabolically mediated binding process of metal to bacteria cell wall) and bioaccumulation (a active metabolic binding process in which metal ions pass the cell membrane and accumulate inside the cell) (Vijayaraghavan, & Yun, 2008). Once the compound has been taken by bacteria, biotransformation can occurs. In the process of biotransformation, either enhanced toxicity or detoxification is possible.

Therefore the objective of this study was to examine the effects of chitosan-modified SeNPs (CS-SeNPs) on lactic bacteria such as *Lactobacillus Bulgaricus*. We evaluate key parameters such as bacteria viability and SeNPs uptake, transformation and localization by using multiple methods. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the distribution of SeNPs in the bacteria and to characterize the synthesized SeNPs. Selenium transformation was evaluated by using high performance liquid chromatography (HPLC) on line coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and the viability of lactic bacteria in presence of SeNPs was assessed by flow cytometry using the live/dead test. Results obtained were compared with those provide by lactic acid bacteria cultured in presence of selenite.

2. Materials and methods

2.1 *Synthesis and characterization of Chitosan-modified SeNPs (CS-SeNPs).*

Chitosan polysaccharide and ascorbic acid purchased from Sigma Aldrich were used for Chitosan modified-SeNPs synthesis. CS-SeNPs were synthesized in the laboratory through the reduction of selenite with ascorbic acid using chitosan as stabilizer as describes in previous literature (Bai, Wang, Zhou, & Zheng, 2008). The best conditions for obtaining spherical CS-SeNPs with an efficiency of formation higher than 95% were: 1000 mgSe/mL as Na_2SeO_3 , 0.1% chitosan, 0.054 M ascorbic acid and pH=5. The particle size and structure were assessed by TEM (JEOL JEM 2100, USA) equipped with a X-Ray energy dispersive spectroscopy (XEDS) microanalysis composition system (Oxford Inca). Samples for TEM analysis were prepared by evaporating a drop of chitosan-modified SeNPs onto a 300 mesh lacey carbon copper grid. The TEM image shows that the NPs present a spherical shape with an average size of 25 ± 5 nm.

2.2. *Bacterial Culture and Nanoparticles application.*

The test strain used in this study was *Lactobacillus Bulgaricus* LB-12, which was obtained from F-DVS, Chr. Hansen's Laboratory (Milwaukee, WI, USA). The bacterial culture were grown in MRS broth (Scharlau, Spain) prepared and sterilized according to the manufacturer's instructions. The cultures were incubated at 37 °C for 24, 48 and 72 h in presence of 1 and 10 mg/mL of selenium as CS-SeNPs and Na_2SeO_3 . Cells were harvested, at the selected incubation times, by centrifugation at 5000 rpm for 5 min at 4 °C and washed twice with 1 mL Milli-Q water. The resulting bacterial cell

pellets and culture media were stored at -80 °C prior to analysis. A control group of unexposed *L. bulgaricus* was cultured in parallel.

2.3. *Selenium content determination by ICPMS.*

The bacteria cell pellets and culture media samples were microwave-digested with 1 mL of concentrated HNO₃ and 0.5 mL of 30% H₂O₂. The resulting solution was diluted to 25 mL with deionized water and selenium concentration was determined using an Agilent 7700-collision/reaction cell ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) by employing H₂ as collision gas for selenium determination. The ICPMS operating conditions are summarized in Table2.

2.4. *Selenium species determination by HPLC-ICPMS.*

Selenium species were determined in both bacteria cell pellets and media by enzymatic hydrolysis followed by HPLC-ICPMS. A two-step enzymatic protocol was used with the aim of improving selenium species extraction efficiency in bacteria cell pellet. First, 500µL of 100 µg/mL of Lysozyme (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in TAE Buffer (pH 7.0; Tris 40 mM, Acetic Acid 20 mM, EDTA 1 mM) were added to 0.050 mg of bacteria cell pellet; the mixture was incubated during 2.5 h at 37 °C. Next 500 µL solution of 100 µg/mL of protease type XIV (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in TAE Buffer were added and sonicated by means of an ultrasonic probe (Sonoplus ultrasonic homogenizer equipped with a 3 mm diameter titanium microtip, Bandenlin, Berlin, Germany) during 50 s at 60% of ultrasound amplitude. For the analysis of selenium species in the culture media, enzymatic hydrolysis was performed in presence of 500 µL of 100 µg/mL protease type XIV in TAE buffer followed by 50 s of probe sonication. The extracts from bacteria cell pellets and media were centrifuged

at 7500 g for 15 min using 0.22 µm cutoff filter and storage to -80 °C until analysis. To evaluate the efficiency of the enzymatic hydrolysis, the selenium concentration in the resulting extracts was determined by ICP-MS using experimental conditions compiled in Table 1. Selenium species in the extracts were analyzed by HPLC-ICPMS using an anion exchange chromatography (Hamilton PRP X-100, 150 mm x 4.6 mm, 10 µm, Hamilton, Switzerland) by following the experimental conditions given in Table 1.

Stock standard solutions of SeMet, MeSeCys and SeCys₂ (Sigma-Aldrich, Germany), were prepared by dissolving them in 3% hydrochloric acid (37%, Merck, Germany). Inorganic selenium solutions were prepared by dissolving sodium selenite (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄), purchased from Merck, in Milli-Q water. Stock solutions of 1000 mg/L were stored at 4 °C, whereas working standard solutions were prepared daily by dilution.

2.5. Flow Cytometry Analysis.

Flow cytometry analyses were performed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.) equipped with a 15 mW, 488 nm, air-cooled argon ion laser and a cell-sorting catcher tub.

2.5.1. Flow Cytometry Assessment of viability of lactic bacteria.

Measurement of viability of *L. Bulgaricus* in presence of CS-SeNPS and selenite was performed using the fluorescent dyes SYTO 9 and PI of the LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit (Molecular Probes, Invitrogen) and by following the manufacturer's instructions. *L. Bulgaricus* were treated with 1 and 10 µg/mL of Se (in form of selenite and CS-SeNPs) for 24 and 48 hours and then centrifuged. Then, bacterial cells were washed, resuspended and diluted with NaCl (0.85% w/v) until to

obtain 1×10^6 bacteria/mL in 1 ml of NaCl solution. Aliquots of 1000 μ L of this diluted bacterial cell suspension were treated with 1.5 μ L of each dye (3.34 mM of Syto 9 dye and 20 mM propidium iodide). Additionally, aliquots of 1000 μ L of diluted bacterial cell suspension were also treated with SYTO 9 alone and PI alone. The samples were incubated for 15 minutes at room temperature in the dark and immediately examined using cytometry analysis.

2.5.2. Flow Cytometry and Annexin V/propidium iodide (PI) staining assay.

The assay was performed by using an Annexin V-FITC kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. *L. Bulgaricus* were treated with 1 μ g/mL of Se in form of selenite and CS-SeNPs during 24 h. Following treatment, cells were harvested and washed twice with PBS re-suspended and diluted until to obtain 1×10^6 cells·mL⁻¹ in 1 ml buffer solution at pH 7.5 consisting of HEPES, NaOH (100 mM), NaCl (1.4 M) and CaCl₂ (25 mM). Aliquots of 500 μ L of this diluted bacterial cell suspension were treated with 5 μ L of Annexin V-FITC conjugate and 2 μ L of 100 μ g/mL PI solution, in order to label the apoptotic and necrotic cells, respectively. Cells were incubates in the dark at room temperature, and immediately examined using cytometry analysis.

2.6. Internalization of CS-SeNPs in bacteria by Transmision electron microsocopy.

Internalization of CS-SeNPs in *L. Bulgaricus* was observed after treatment with 1 and 10 μ gSe/mL during 48 h. Following exposure, attached bacteria were fixed *in situ* with glutaraldehyde (2.5% v/v) and p-formaldehyde (4% v/v) in PBS at 4 °C for 4 h. Bacteria were then washed and stored in PBS at 4 °C overnight. After post-fixation with osmium tetroxide (1% v/v) for 1 h at room temperature and in the dark, the bacteria

were dehydrated in graded ethanol series (from 30% to 100% ethanol) and harvested with propylene oxide. Bacteria suspensions were centrifuged at 1500 rpm for 30 seconds and the propylene oxide was removed. The pellets were treated with a mixture of resin:acetone and finally, treated with 100% resin. The resulting blocks were incubated at 65 °C for 48 h until complete embedding. Ultrathin sections were cut, transferred onto copper grids and examined by TEM.

3. Results and discussion

3.1. *Synthesis and characterization of CS-SeNPs.*

Nanoparticles were synthesized in the laboratory through the reduction of selenite with ascorbic acid using chitosan as stabilizer. The method is based on previous reported by Bay *et al* [17] where water-soluble polysaccharides (chitosan, konjac glucomannan, carboxymethyl cellulose, and acacia gum) were used as modifiers or stabilizers of SeNPs. The synthesis medium used in the present work for obtaining spherical SeNPs have been reported elsewhere (Palomo-Siguero, López-Heras, Cámara, & Madrid, 2015) and consist of 0.1% chitosan, 0.054 M ascorbic acid at pH=5. Diameter and shape of the synthesized NPs was measured by using TEM. According to transmission electron microscopy results (Figure 1), SeNPs with an average diameter of 25 ± 5 nm were obtained under conditions mentioned above.

3.2. *Accumulation and biotransformation of CS-SeNPs by Lactobacillus Bulgaricus.*

As it has been reported in the literature selenium is accumulated by lactic bacteria and then transformed to organoseleno compounds, mainly selenocysteine. However, in all the studies selenite is used as source of selenium. With the aim of gaining a deeper insight into how SeNPs are accumulated and biotransformed in lactic

bacteria, *Lactobacillus Bulgaricus* were grown in presence of CS-SeNPs and selenite (Na_2SeO_3), for comparison purposes. First the effect of selenite and CS-SeNPs concentration on the bacterial growth was evaluated by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600}). OD_{600} data collected from bacterial cultures in absence and presence of selenium (as Se(IV) and CS-SeNPs) at two levels of exposure (1 and 10 $\mu\text{g/mL}$ of selenium) are shown in Figure 2. As it is shown in Figure 2A, no significant differences in curve growth profile between selenium-enriched and control bacteria were observed when adding 1 $\mu\text{gSe/mL}$ either as Se(IV) or CS-SeNPs. In contrast, bacteria growth rate decline when increasing selenium concentration up to 10 $\mu\text{g Se/mL}$ being this effect more accused when selenium was supplemented as selenite (Figure 2B). Additionally, the reagents used for preparing CS-SeNPs have not influence on *L. Bulgaricus* growth as shown in Figure 2B. Afterwards, the bacteria cell pellet and culture medium were collected and analyzed by ICPMS for the quantitative determination of total selenium, by following the experimental conditions given in Table1. The Figure 2C and 2D show the percentage of selenium accumulated by bacteria when selenium was applied as selenite and CS-SeNPs, respectively. When dosing with 1 $\mu\text{g Se/mL}$, accumulation percentages as low as 7% and 20% were obtained by adding selenium as selenite and CS-SeNPs, respectively, being these values independent on the time of exposure (24, 48, 72 hours, corresponding at stationary phase of the bacterial culture growth in Figure 2A). However, selenium accumulation drastically increases when increasing selenium level of exposure (10 $\mu\text{g Se/mL}$) with values of 60 and 70 % for Se(IV) and CS-SeNPs, respectively. It is important to indicate that the sum of selenium concentration in the bacterial cell pellet and the culture medium was equal to the selenium concentration added. Selenium accumulation values were independent on the time of incubation: 24 h (log phase in Fig 2B) and 48 and 72 h (stationary phase of bacterial culture growth in

Figure 2B), suggesting that selenium is mainly accumulated during the log phase recognized as the point where bacteria divided as rapidly as possible. More importantly, after incubation of *L. Bulgaricus* in presence of 10 µg Se/mL of selenite, the colour of the bacterial pellet turned red due to the reduction of selenite to elemental selenium whereas no difference was noted in *L. Bulgaricus* grown in presence of CS-SeNPs at the same level of exposure. These observations were later corroborated by TEM measurements.

Once selenium accumulation was evaluated, selenium species in the bacteria cell pellet and culture medium were determined by HPLC-ICPMS. First selenium species were extracted using an enzymatic hydrolysis with lysozyme (with and without protease type XIV) in a buffered media such as TAE. As shown in Table 2, the best results in terms of recovery values were obtained when using a mixture of lysozyme and protease type XIV and by following the procedure described in materials and methods section. Under these conditions, recovery values were close to 100%. In contrast, low extraction yields were attained when using lysozyme alone or protease alone. Lysozyme is an enzyme characterized by its ability to break down the bacterial cell wall, improving protein or nucleic acid extraction efficiency. Therefore, the effectiveness of protease is dependent on performing a previous incubation step with lysozyme. Selenium species from culture medium were extracted by using protease alone with extraction yields around 99%.

The resulting extracts were then analyzed by using anion exchange chromatography on line coupled to ICPMS by applying the operating conditions given in Table 1. The chromatograms of selenium species obtained corresponding to bacteria grown in presence of selenite and CS-SeNPs at 24 h incubation time are shown in Figure 3. The main species found in the chromatograms, by comparison of the retention

time of the standards and by spiking experiments were SeCys₂, SeMet and Se(IV). The selenium speciation results reported in Figure 3 show that the distribution of selenium is remarkably different depending on the selenium chemical form added to the culture media. In those bacterial grown in CS-SeNPs enriched media, SeCys₂ and SeMet were identified, finding that 95% and 70% of the selenium content was transformed into the organic species when applied 1 and 10 µg Se/mL respectively, being SeCys₂ the major selenium organocompound. In contrast, for those bacteria grown in selenite media, only 40% of the selenium was found to be present as organic forms, whereas the remaining selenium is Se(IV), suggesting that *Lactobacillus* were more efficient in transforming SeNPs than selenite. The results obtained are in agreement with previous reports appeared in the literature indicating that selenium, when supplementing as selenite, is mainly transformed to SeCys₂ by lactic bacteria (Alzate, Fernández-Fernández, Pérez-Conde, Gutiérrez, & Cámara, 2008; Alzate et al, 2007). This selenoamino acid takes part of selenoproteins such as glutathione peroxidase (GPx) which plays an important role in antioxidant system, degrading the hydroperoxides and hydrogen peroxide. The results obtained here evidence that lactic bacteria are also able to biotransform SeNPs to selenocompounds, mainly SeCys₂, but at a higher rate than when selenite is added the culture medium.

3.3. Flow Cytometric Assesment of viability of *Lactobacillus bulgaricus* in presence of CS-SeNPs.

The LIVE/DEAD BacLight™ kit, which contains the dyes SYTO 9 and propidium iodide, was used to stain the bacteria cells for flow cytometry analysis. Green fluorescing SYTO9 is able to enter all cells and is used for assessing total cell counts, whereas red fluorescing PI enters only cells with damaged cytoplasmic membranes. For

this study, *L. Bulgaricus* were grown in presence of selenite and CS-SeNPs at two concentrations levels (1 and 10 $\mu\text{g Se/mL}$) during 24 and 48 h exposure time. Figure 4 shows the percentage of bacterial cells stained with SYTO 9 (intact cells) and with PI (damaged cells). After 24 h of exposure over 80% of bacteria cells were viable being the results independent on the selenium chemical form applied and level of exposure. In contrast, when increasing selenium level of exposure up to 10 $\mu\text{g Se/mL}$ during 48 h, the presence of selenite significantly decreased the viability of the exposed cells (up to 30%) whereas CS-SeNPs barely affected bacteria cell viability in comparison to control bacteria cells. In fact, bacteria exposed to 1 and 10 $\mu\text{g Se/mL}$ in form of CS-SeNPs do not show differences in the viability even at 48h of exposure. The results suggest that the presence of CS-SeNPs, until 10 $\mu\text{g Se/mL}$ does not compromise the membrane integrity and bacteria cells viability. A similar behaviour of SeNPs on cell viability of MCF-7 cell line has been observed by other authors (Lopez-Heras et al, 2014; Estevez, Garcia-Lidon, Luque-Garcia, & Camara, 2014; Forootanfar et al, 2014). The high rate of biotransformation of SeNPs to SeCys₂ and other organic forms by *L. Bulgaricus* in presence of CS-SeNPs is likely the reason of the differences observed in the viability.

3.4. CS-SeNPs induce phosphatidylserine (PS) exposure at the outer membrane.

It has been reported that exposure of eukaryotic cells to NPs can increase ROS production and lipid peroxidation, which ultimately can cause apoptosis. One of the earlier events of apoptosis includes translocation of membrane phosphatidylserine (PS) from the inner side of the plasma membrane to the outer leaflet of the plasma membrane surface. Annexin V, a Ca²⁺-dependent phospholipid-binding protein, has high affinity for PS, and therefore fluorochrome-labeled Annexin V is used for detecting

extracellular PS using flow cytometry. In the current work we try to detect extracellular PS in *L. Bulgaricus* after exposure to selenite and CS-SeNPs.

The percentages of Annexin V-positive bacterial cells were: 0.4 ± 0.4 , 7.4 ± 0.6 , and 6.3 ± 0.5 for unexposed, Se (IV) and CS-SeNPs-treated bacteria, respectively, when adding 1 μg Se/mL during 24 h. The results indicated a modest but significant Annexin V staining of Se (IV) and CS-SeNPs treated *L. Bulgaricus*. It is important to mention that exposure to Annexin V-positive cells was not accompanied with a loss of membrane integrity (monitored by staining with the fluorescent intercalating dye, PI,) indicating that PS exposure was primarily detected at the outer membrane. In contrast, the Annexin V-Affinity Assay Apoptosis does not provide any conclusive results when *L. Bulgaricus* were cultured in presence 10 $\mu\text{gSe/mL}$ added as selenite during 48 h. The reason of these results may due to the loss of membrane integrity as it was observed by staining with Syto9/PI. The results show here indicated that at low selenium levels of exposure (1 $\mu\text{gSe/mL}$ during 24 h), selenium-induced bacterial cell death is accompanied of extracellular exposure of PS, a marker of eukaryotic apoptosis. However the term apoptosis in bacteria is a quite controversial issue. Recent studies by Dwyer et al. (Dwyer, Camacho, Kohanski, Callura, & Collins, 2012) suggest that *E. coli* also exhibit characteristic markers of apoptosis when facing bactericidal antibiotic treatment. Others reported that the term apoptosis should be avoided when working with bacteria (Hacker et al, 2013). In bacteria, PS is distributed between inner and outer membranes and represents less than 1% of membrane lipids bacteria due to its rapid conversion to phosphatidylethanolamine by the membrane bound enzyme, PS decarboxylase (Schuiki, & Daum, 2009). In mammalian cells, annexin V binding typically signifies the appearance of PS on the outer leaflet of the plasma membrane, which is usually associated with the activation of the apoptotic pathway. In bacteria, we

do not have the certainty that the binding of annexin V indicates PS-exposure and therefore apoptosis. For instance, situations have been described where high concentrations of PS appear on the outer bacterial membrane (when the PS-decarboxylase activity is reduced (Dwyer, Camacho, Kohanski, Callura, & Collins, 2012)). However, there is no indication that this actually happens during bacterial ‘apoptosis’. The results obtained here show differences in Annexin V staining between control-bacteria and Se(IV) and CS-SeNPs treated *L. Bulgaricus*. It seems to be that selenium induce PS exposure, however the results are very tenuous to be conclusive.

3.5. Internalization of CS-SeNPs by TEM.

The degree of cellular internalization is a potential relevant factor for understanding the biological mechanisms affected by CS-SeNPs exposure. TEM was used for bacteria localization of the internalized CS-SeNPs with the purpose of confirming whether or not the SeNPs were really inside the bacteria or just attached to the membrane. Transmission electron micrographs of unexposed (Figure 5A1-5A2) and selenium-treated bacteria are depicted in Figure 5B-5C. Only micrographs of bacterial strains treated with 10 µg Se/mL of selenite and CS-SeNPs are shown since no differences in bacterial cells morphology were observed when treating *Lactobacillus* with 1µg Se/mL. The TEM micrographs observed from Figure 5B1 to 5B2 correspond to bacteria exposed to 10 µg Se/mL of selenite. The micrograph of Figure 5B1 suggests that selenite interact with the bacteria cell membrane causing physical damage as it pass through the membrane. These findings are consistent with our previous results from viability assays by fluorescence staining with Syto9/PI. Moreover, as it was previously mentioned, after incubation of *L. Bulgaricus* in presence of 10µg Se/mL of selenite, the colour of the bacterial pellet turned red due to the reduction of selenite to elemental

selenium. TEM results (Figure 5B1) showed the presence of spherical SeNPs distributed inside and outside of the bacterial cell, being these nanoparticles responsible of the red colored bacterial pellet obtained when dosing bacteria with 10µg/mL of selenite. TEM analysis of the biologically synthesized SeNPs (Figure 5B2) provide particle size diameter of around 100 nm. The presence of selenium in these nanoparticles was confirmed by XEDS which spectra denotes the presence of Se absorption peaks consisting of SeL_α, SeK_α and SeK_β at 1.4, 11.22 and 12.49 keV, respectively. Many works has reported the fact that bacteria can reduce metals as a mechanism to improve resistance toxicity. The results obtained are in agreement with different works appeared in the literature where SeNPs are biologically synthesized in presence of Se (IV) by living systems (Forootanfar et al, 2014; Shakibaie, Forootanfar, Golkari, Mohammadi-Khorsand, & Shakibaie, 2014; Durán et al, 2011; Beheshti et al, 2013; Alzate, Pérez-Conde, Gutiérrez, & Cámara, 2010).

In contrast, Figures from 5C1 and 5C2 show that CS-SeNPs readily enter in the bacteria cells (Figure 5C1) preserving membrane integrity and therefore causing no cellular damage (Figure 5C2). Surprisingly, no biologically synthesized SeNPs of a size of 100 nm were detected when bacteria were exposed to CS-SeNPs suggesting again that *L. Bulgaricus* are more tolerant to selenium when being applied as CS-SeNPs. As mentioned above, *Lactobacillus* was more efficient in transforming SeNPs than selenite which it could explain the differences observed in toxicity.

4. Conclusions

This study, for the first time, shows that *L. Bulgaricus* are able to accumulate and biotransform selenium nanoparticles. The chemical form in which selenium is present in the culture media notably affects the distribution of selenium species. A low

transformation into organic forms was observed when LAB were exposed to selenite, with Se(IV) being the major Se-specie identified. Meanwhile in bacteria grown in SeNPs-enriched media practically all the selenium content was identified as seleno aminoacids. The fact that *Lactobacillus* was more efficient in transforming SeNPs than selenite may explain the differences observed in viability. Results from live/dead assays implied that SeNPs killed approximately 20% of *Lactobacillus* after 24 hours while the percentage increase up to 60% of bacteria when selenite was applied. TEM measurements show that CS-SeNPs were located inside the bacteria cells without compromising the integrity of the bacteria. In general LAB was more tolerant to CS-SeNPs than to selenite. The results presented in this manuscript highlight the importance of the biological system in the transformation of nanoparticles and open new frontiers in the combined use of the beneficial effects of selenium nanoparticles and LAB in fields such as medicine and food technology.

Acknowledgments.

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2011-22732), the Community of Madrid/ FEDER programme (S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM). The authors also thank to the Complutense University Flow Cytometry Core (ICTS-CNME).

References

- Pieniz, S., Andreazza, R., Anghinoni, T., Camargo, F. & Brandelli, A. (2014). Probiotic Potential, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Enterococcus Durans* Strain LAB18s. *Food Control*, 37, 251–256.
- Yang, J., Huang, K., Qin, S., Wu, X., Zhao, Z., & Chen, F. (2009). Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. *Digestive Disease Science*, 54(2), 246–254.

- 1 Iang, Q. (2007). Enriched Selenium and Its Effects on Growth and Biochemical
2 Composition in *Lactobacillus Bulgaricus*, 55, 2413–2417.
- 3 Palomo, M., Gutiérrez, A. M., Pérez-Conde, M. C., Cámara, C., & Madrid, Y. (2014).
4 Se Metallomics during Lactic Fermentation of Se-Enriched Yogurt. *Food*
5 *Chemistry*, 164, 371–379.
- 6 Alzate, A., Fernández-Fernández, A., Pérez-Conde, M. C., Gutiérrez, A. M., & Cámara,
7 C. (2008). Comparison of Biotransformation of Inorganic Selenium by
8 *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in Lactic Fermentation Process of Yogurt and
9 Kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8728–8736.
- 10 Alzate, A., Cañas, B., Pérez-Munguá, S., Hernández-Mendoza, H., Pérez-Conde, C.;
11 Gutiérrez, A. M., & Cámara, C. (2007). Evaluation of the Inorganic Selenium
12 Biotransformation in Selenium-Enriched Yogurt by HPLC-ICP-MS. *Journal of*
13 *Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9776–9783.
- 14 Galano, E., Mangiapane, E., Bianga, J., Palmese, A., Pessione, E., Szpunar, J., Lobinski,
15 R., & Amoresano, A. (2013). Privileged Incorporation of Selenium as
16 Selenocysteine in *Lactobacillus Reuteri* Proteins Demonstrated by Selenium-
17 Specific Imaging and Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12,
18 2196–2204.
- 19 Peng, D., Zhang, J., Liu, Q., & Taylor, E. W. (2007). Size Effect of Elemental Selenium
20 Nanoparticles (Nano-Se) at Supranutritional Levels on Selenium Accumulation
21 and Glutathione S-Transferase Activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101,
22 1457–1463.
- 23 Luo, Y., Zeng, H., Zhang, S., Cheng, W.H., Wang, Q., Tian, F., & Song, J. (2011).
24 Encapsulation of Selenium in Chitosan Nanoparticles Improves Selenium
25 Availability and Protects Cells from Selenium-Induced DNA Damage Response.
26 *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 1137–1142.
- 27 El-Ramady, H. R., Domokos-Szabolcsy, É., Abdalla, N., Alshaal, T., Shalaby, T.,
28 Sztrik, A., Prokisch, J., & Fári, M. (2014). Selenium and Nano-Selenium in
29 Agroecosystems. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 495–510.
- 30 Lopez-Heras, I., Sanchez-Diaz, R., Anunciação, D., Madrid, Y., Luque-Garcia, J. L., &
31 Camara, C. (2014). Effect of Chitosan-Stabilized Selenium Nanoparticles on Cell
32 Cycle Arrest and Invasiveness in Hepatocarcinoma Cells Revealed by
33 Quantitative Proteomics. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 5.
- 34 Estevez, H., Garcia-Lidon, J. C., Luque-Garcia, J.L., & Camara, C. (2014). Effects of
35 Chitosan-Stabilized Selenium Nanoparticles on Cell Proliferation, Apoptosis and
36 Cell Cycle Pattern in HepG2 Cells: Comparison with Other Selenospecies.
37 *Colloids Surfaces B and Biointerfaces*, 122C, 184–193.
- 38 Tran, P.A., & Webster, T.J. (2011). Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus*
39 *aureus* growth. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1553–15.

- 1 Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., & Roy,
2 N.C. (2013). The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-
3 Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*, .
4
- 5 Mrvčić, J., Stanzer, D., Solić, E., & Stehlik-Tomas, V. (2012). Interaction of Lactic
6 Acid Bacteria with Metal Ions: Opportunities for Improving Food Safety and
7 Quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2771–2782.
8
- 9 Vijayaraghavan, K., & Yun, Y.S. (2008). Bacterial Biosorbents and Biosorption.
10 *Biotechnology Advances*, 26, 266–291.
11
- 12 Bai, Y., Wang, Y., Zhou, W., & Zheng, W. (2008). Modification and modulation of
13 saccharides on elemental selenium nanoparticles in liquid phase. *Material Letters*,
14 62, 2311- 2314.
15
- 16 Palomo-Siguero, M., López-Heras, M. I., Cámara, C., & Madrid, Y. (2015).
17 Accumulation and Biotransformation of Chitosan-Modified Selenium
18 Nanoparticles in Exposed Radish (*Raphanus Sativus*). *Journal of Analytical and*
19 *Atomic Spectrometry*, 30, 1237-1244.
20
- 21 Forootanfar, H., Adeli-Sardou, M., Nikkhoo, M., Mehrabani, M., Amir-Heidari, B.,
22 Shahverdi, A.R., & Shakibaie, M. (2014). Antioxidant and Cytotoxic Effect of
23 Biologically Synthesized Selenium Nanoparticles in Comparison to Selenium
24 Dioxide. *Journal of Trace Elementes on Medicine and Biology*, 28, 75–79.
25
- 26 Dwyer, D. J., Camacho, D.M., Kohanski, M.A., Callura, J.M., & Collins, J.J. (2012).
27 Antibiotic-Induced Bacterial Cell Death Exhibits Physiological and Biochemical
28 Hallmarks of Apoptosis. *Molecular Cell*, 46, 561–572.
29
- 30 Hacker, G. (2013). Is there, and should there be, apoptosis in bacteria. *Microbes and*
31 *Infection*, 15, 640-644
32
- 33 Schuiki, I., & Daum, G. (2009). Phosphatidylserine Decarboxylases, Key Enzymes of
34 Lipid Metabolism. *IUBMB Life*, 61, 151–162.
35
- 36 Shakibaie, M., Forootanfar, H., Golkari, Y., Mohammadi-Khorsand, T., & Shakibaie,
37 M.R. (2014). Anti-Biofilm Activity of Biogenic Selenium Nanoparticles and
38 Selenium Dioxide against Clinical Isolates of *Staphylococcus Aureus*,
39 *Pseudomonas Aeruginosa*, and *Proteus Mirabilis*. *Journal of Trace Elements on*
40 *Medicine and Biology*, 29, 235-241.
41
- 42 Durán, N., Marcato, P.D., Durán, M., Yadav, A., Gade, A., & Rai, M. (2011).
43 Mechanistic Aspects in the Biogenic Synthesis of Extracellular Metal
44 Nanoparticles by Peptides, Bacteria, Fungi, and Plants. *Applied Microbiology*
45 *and Biotechnology*, 90, 1609–1624.
46
- 47 Beheshti, N., Soflaei, S., Shakibaie, M., Yazdi, M.H., Ghaffarifar, F., Dalimi, A., &
48 Shahverdi, A.R. (2013). Efficacy of Biogenic Selenium Nanoparticles against
49 *Leishmania Major*: In Vitro and in Vivo Studies. *Journal of Trace Element on*
50 *Medicine and Biology*, 27, 203–207.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Alzate, A., Pérez-Conde, M.C., Gutiérrez, A.M., & Cámara, C. (2010). Selenium enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *International Dairy Journal*, 20, 761-769.

Table 1. Operating Conditions for HPLC coupled to ICPMS

Operating Conditions	
ICPMS parameters for Se determination	
RF Power (W)	1550
Plasma gas flow rate (L/min)	15.0
Ar auxiliar flow rate (L/min)	0.30
Carrier gas flow rate (L/min)	0.75
Nebulizer	Slurry
Spray Chamber	Scott
Adquisition mode	Continuous
Isotopes monitored	^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se
Replicates	3
Reaction gas	H_2
Reaction gas flow rate ($\text{mL} \cdot \text{H}_2 \cdot \text{min}^{-1}$)	6
AEX chromatographic parameters	
Column	Hamilton PRP X-100 (150 mm x 4.6 mm, 10 μm)
Mobile phases	Ammonium citrate 10 mM, 2% MeOH (pH 5.0)
Mode	Isocratic
Flow rate ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	1
Injection volume (μL)	100

Table 2. Optimization of the enzymatic hydrolysis protocol used for extracting selenium from cell bacteria pellet and culture medium from exposed bacteria. Level of exposure $1 \mu\text{g Se} \cdot \text{mL}^{-1}$

Sample	Enzymatic Hydrolysis Procedure	$\mu\text{g Se extracted}$	$\mu\text{g Se}_{\text{total}}$	Extraction efficiency(%)
Bacteria Cell Pellet	Lisozime	5.4 ± 0.4	8.8 ± 0.4	61
	Protease	6.9 ± 0.7	8.8 ± 0.4	78
	Lisozime + Protease	8.5 ± 0.5	8.8 ± 0.4	96
Culture Medium	Protease	39 ± 1	39 ± 4	≥ 99

Mean \pm standard error N=3 replicates.

Figure captions

Figure 1. TEM image and XEDS spectra of CS-SeNPs at pH=5. $T=20 \pm 1$ °C, 0.1% Chitosan, 0.054 M ascorbic acid and $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of selenium. CS-SeNPs average particle size of 25 ± 5 nm. Red arrows indicate the Se absorption peaks consisting of SeL_{α} , SeK_{α} and SeK_{β} at 1.4, 11.22 and 12.49 keV, respectively.

Figure 2. Effect of CS-SeNPs and selenite on bacteria growth curve and selenium accumulation. Bacteria growth curve in presence of selenite and CS-SeNPs, at two levels of exposure A) $1 \mu\text{g Se/mL}$ and B) $10 \mu\text{g Se/mL}$. Selenium accumulation in C) selenite-exposed bacteria and D) CS-SeNPs-exposed bacteria, at different times of exposure. Data are expressed as mean \pm standard error $N=3$ replicates.

Figure 3. Transformation of CS-SeNPs and selenite by *Lactobacillus Bulgaricus*. Anion-exchange HPLC–ICP–MS chromatogram of hydrolyzed extracts of bacteria pellet after exposure to A) $1 \mu\text{g Se/mL}$ and B) $10 \mu\text{g Se/mL}$ during 24 h. Percentage of Se(IV) and CS-SeNPs biotransformation at two exposure levels C) 1 and D) $10 \mu\text{g Se/mL}$. Data are expressed as mean \pm standard error $N=3$ replicates.

Figure 4. Percentages of cell viability of *Lactobacillus Bulgaricus* after treatment with selenite and CS-SeNPs at two levels of exposure A) $1 \mu\text{g Se/mL}$ and B) $10 \mu\text{g Se/mL}$. Data are expressed as mean \pm standard error $N=3$ replicates.

Figure 5. Transmission electron micrographs of un-exposed bacteria (A1-2) and exposed bacteria treated with $10 \mu\text{g Se/mL}$ for 48 h, as selenite (B1-2) and as CS-SeNPs (C1-2). Red arrows indicate the presence of nanoparticles.

Figure 1

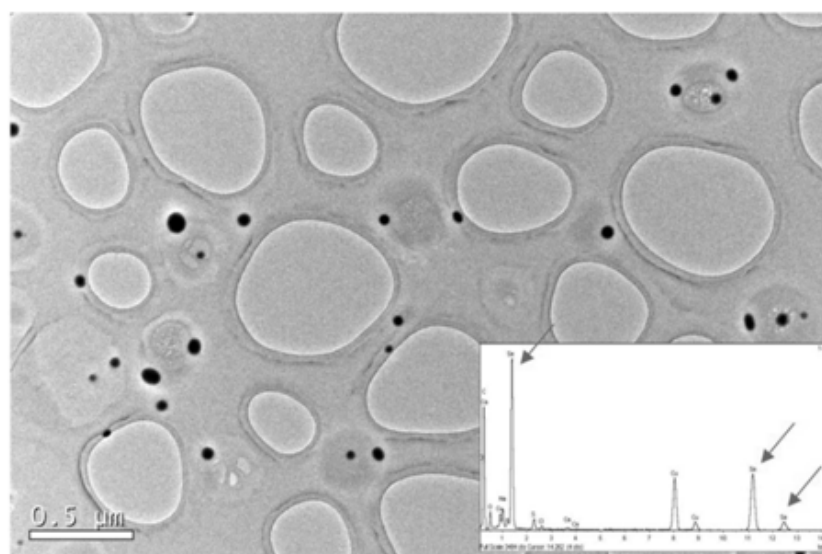


Figure 1.

Figure 2

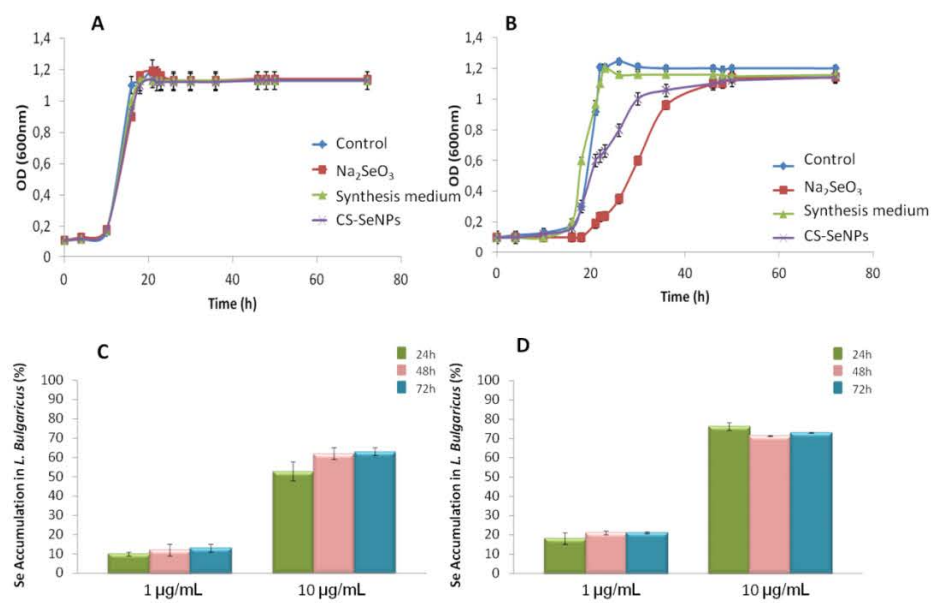


Figure 2.

Figure 3

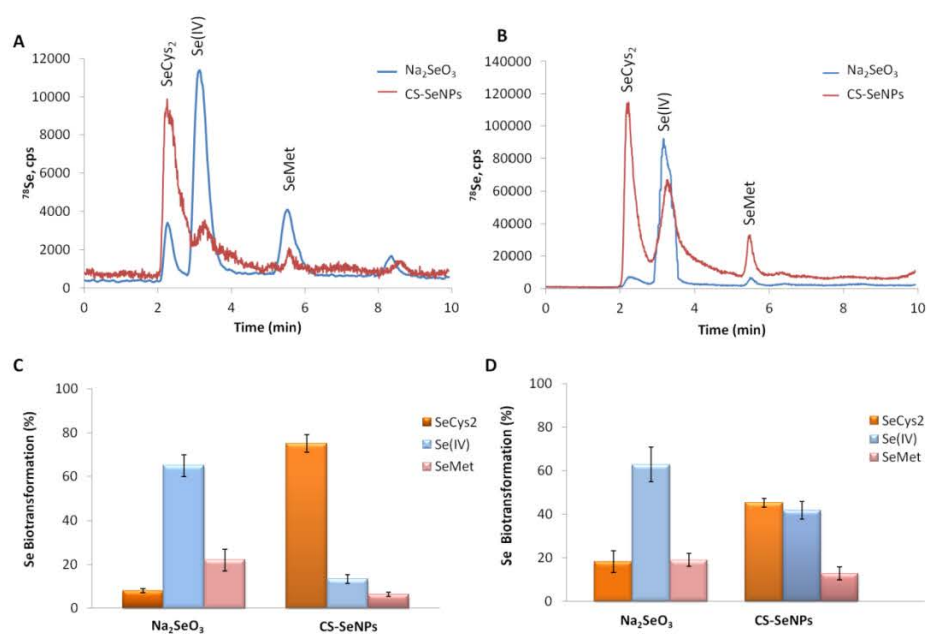


Figure 3.

Figure 4

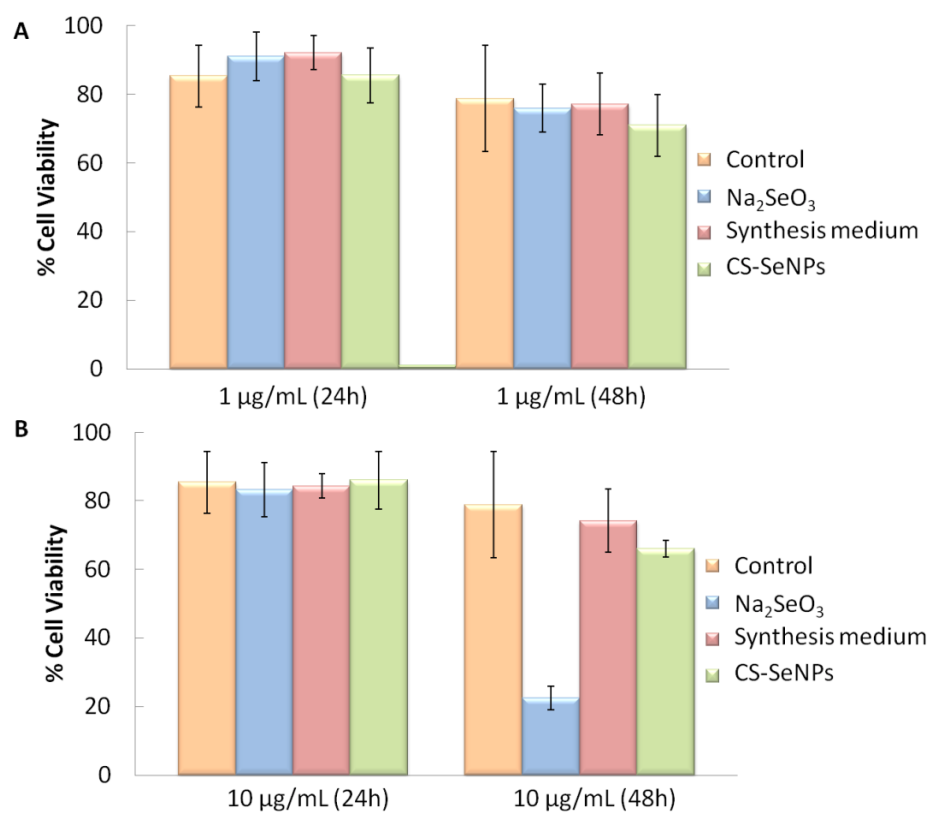


Figure 4.

Figure 5

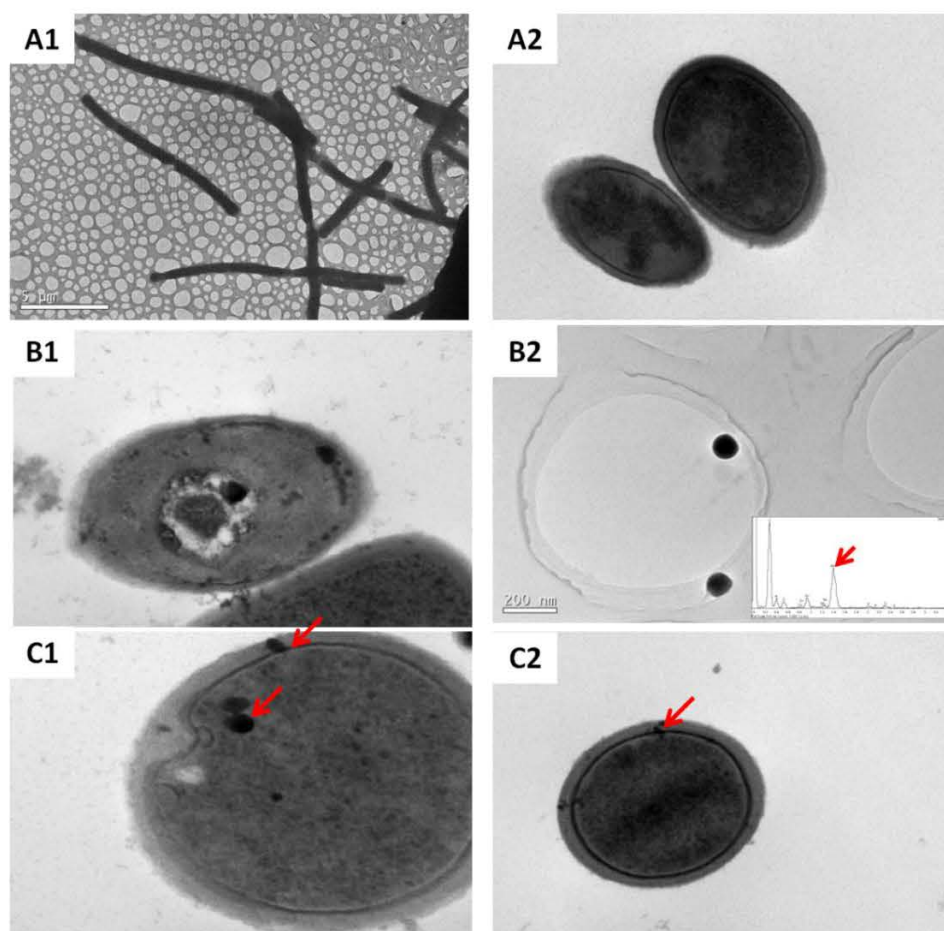


Figure 5.

II.2.2. Dependencia del agente estabilizante en la toxicidad de SeNPs en *Lactobacillus Bulgaricus*

“Evaluation of coating material dependent on toxicity of SeNPs to *L.
Bulgaricus*”

Analyst (*Enviado*)

**Evaluation of coating material dependent toxicity of SeNPs to *Lactobacillus*
Bulgaricus. Characterization by a multi- technique approach**

Maria Palomo-Siguero,^a Yolanda Madrid^{a*}

^aDepartamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad

Complutense de Madrid. Avda Complutense s/n. 28040 Madrid. Spain

Address correspondence to ymadrid@ucm.es

ABSTRACT

In the current study the toxicity of three types of SeNPs to *Lactobacillus Bulgaricus* was evaluated. SeNPs were synthesized using three types of coating materials (chitosan (CS-SeNPs), hydroxyethyl cellulose (HEC-SeNPs) and a non ionic surfactant (ethoxylated-SeNPs)). Morphologies of SeNPs were all spherical, with sizes in the range of: 25 ± 5 nm (CS-SeNPs), 53 ± 6 nm (ethoxylated-SeNPs) and 101 ± 6 nm (HEC-SeNPs), allowing us to examine SeNPs toxicity against bacteria from a double aspect: nature of capping agent and diameter size. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the distribution of SeNPs in the bacteria and to characterize the synthesized SeNPs. Selenium transformation was performed by using high performance liquid chromatography (HPLC) on line coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Viability of lactic bacteria in presence of SeNPs was assessed by flow cytometry. The presence of HEC-SeNPs or CS-SeNPs barely affects the viability of the exposed bacteria even at a level of exposure of $10 \mu\text{gSe} \cdot \text{mL}^{-1}$. CS-SeNPs are metabolically transformed to SeCys. The presence of $10 \mu\text{gSe} \cdot \text{mL}^{-1}$ in form of ethoxylated-SeNPs produces a dramatic decrease of bacterial cell viability, suggesting the surfactant employed in the synthesis of SeNPs as the main responsible of the drastic decrease in bacterial cell viability. Results show the importance of capping agent when

establishing the true toxicity of NPs. Unfortunately, this crucial information is missing in most of the reported toxicity studies.

Key words: Selenium nanoparticles; *Lactobacillus*; biotransformation; Inductively coupled plasma-mass spectrometry; Flow Cytometry; Transmission Electron Microscopy.

Introduction

In the recent years, nanoparticles within the size range of 100 nm have become an area of extensive research and concern due to their potential application in wide areas of science and technology. The increasing use of nanoparticles has led to an urgent need to evaluate the impact of these on humans and environment. To date the potential toxicity of nanoparticles and their interaction mechanisms with cells and living organisms has not been fully assessed. Although, the exact toxicity mechanisms of NPs are still unclear, many proposed mechanisms can be found in the literature. These mechanisms include, association of NPs with cell membranes that might cause physical damage (e.g., pitting) or the subsequent penetration that cause cell malfunction,^{1,2} stimulation of reactive oxygen species and interaction with specific proteins and/or enzymes inhibiting their activities. Many factors can impact the toxicity of nanoparticles such as, size, shape, chemical composition and capping agent. It is accepted that the fate and toxicity of NPs is largely influenced by the physical interaction between the NPs surface and the cellular membranes or bacteria examined. Several authors even indicate that the capping agent located on their surface to enhance stability is the most important factor in evaluating NPs toxicity. Unless the barrier between the NPs and the bacteria or cell is overcome, other toxicity factors (i.e., shape and size) may have minimal impact on the toxicity of these nanoparticles.³ Moreover, the use of stabilizer may hinder the normal utilization of synthesized nanoparticles in biological applications and further stabilizer may

have toxic potential due to its chemical nature. Various studies have shown that NPs of similar size and different chemical composition can exhibit very different cytotoxic effects, indicating that size alone is not exclusively the determining toxicity factor. Adams et al.⁴ tested the antibacterial effects of three metal oxide ENPs towards the bacteria *Bacillus subtilis* and *E. coli* and observed the highest effects for ZnO, followed by TiO₂ and finally SiO₂.

Selenium (Se) is an essential element to humans and plays an important role in a number of biological processes involving: immune and reproductive systems, thyroid function and redox balance.⁵ Beneficial effects of Se have been found to be dependent on the supplemental form and its efficacy. Selenium nanoparticles (SeNPs) appears to be more effective than that of other Se sources like sodium selenite, selenomethionine, and selenium-methylselenocysteine^{6,7} in inducing selenoenzymes like glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TRx), scavenging of free radicals, prevention of oxidative DNA damage through potent antioxidant activity, and antiapoptotic properties.^{6,8} Others reported inhibitory effects of SeNPs on the growth of some types of bacteria as *Streptomyces aureus*.⁹

The main synthetic approach for preparing selenium nanoparticles is by chemical reduction, employing reducing agent (citric, ascorbic and GSH for instance) and stabilizers such as proteins (BSH) or water-soluble polysaccharides (chitosan, konjac glucomannan, carboxymethyl cellulose, and acacia gum). According to the existing literature very few data about the effect of SeNPs on lactic acid bacteria has been reported so far. It has been published that the health-promoting benefits of LAB can be enhanced by the presence of selenium. In this line, selenium-enriched probiotics have been shown to strongly inhibit the growth of pathogenic *Escherichia Coli* *in vivo* and *in vitro*.¹⁰ Moreover, accumulation and biotransformation of selenium by lactic bacteria have been reported in several papers.¹¹⁻¹⁵ These works shown that selenium is accumulated by various *Lactobacillus* species and then

biotransformed into selenoamino acids such as selenomethionine (SeMet) and selenocysteine (SeCys). However, in all above-mentioned studies, selenium was supplemented as selenite.

The current study aimed at utilizing a multiple method for evaluating the toxicity of three different SeNPs suspensions on *Lactobacillus Bulgaricus* (Gram-positive bacteria). Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the distribution of SeNPs in the bacteria and to characterize the synthesized SeNPs. Selenium transformation was evaluated by using high performance liquid chromatography (HPLC) on line coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and the viability of lactic bacteria in presence of SeNPs was assessed by flow cytometry using the live/dead test. SeNPs synthesis was performed in presence of either a polysaccharide, (e.g., chitosan, a Poly(D-glucosamine); a polymer (hydroxyethyl cellulose (HEC)) or an ethoxylated non-ionic surfactant (2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate) as capping agents. The evaluated coated agents were selected as being compatible compounds with food packaging and food technology, the main area of application of lactic bacteria.

Experimental

Chemicals

All chemicals and reagents used were of analytical grade and solutions were prepared with de-ionized water (18 M Ω cm) obtained from a Milli-Q water purification system unit (Millipore, USA). Stock standard solutions of SeMet, MeSeCys and SeCys₂ (Sigma-Aldrich, Germany), were prepared by dissolving them in 3% hydrochloric acid (37 %, Merck, Germany). Inorganic selenium solutions were prepared by dissolving sodium selenite (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄), purchased from Merck, in Milli-Q water. Stock solutions of 1000 mg·L⁻¹ were stored at 4 °C, whereas working standard solutions were prepared daily by dilution. The stabilizing agents used for the synthesis were the polysaccharide Chitosan,

derived from shrimp shells ($340 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ MW and $\geq 75\%$ deacetylation degree); a non-ionic surfactants: 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate from Sigma and a polymer such as hydroxyethyl cellulose from Sigma. Ascorbic acid was purchased from Sigma-Aldrich.

Total selenium concentration in SeNPs treated bacteria pellet and culture media was determined by acid digestion of samples using HNO_3 (Merck) and 30 % hydrogen peroxide (Panreac). Selenium species from SeNPs treated bacteria pellet were extracted by enzymatic hydrolysis using Protease XIV and Lysozyme from Sigma in presence of a Tris-Acetate-EDTA (TAE) Buffer, (consisting of Tris 40 mM, Acetic Acid 20 mM, EDTA 1 mM at pH 7.0). Selenium species separation was performed by anionic-exchange chromatography by using citric acid 10 mM (Sigma) in 2% MeOH (99.9%, Scharlau) adjusted to pH 5 with ammonium hydroxide (Fluka) as mobile phase.

The fluorescent dyes SYTO 9 and PI of the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] bacterial viability kit (Molecular Probes, Invitrogen) were used for determining bacteria membrane integrity.

Synthesis of Selenium Nanoparticles

SeNPs were prepared according to the procedure described by Bai et al [20] consisted of a chemical reduction of selenite with ascorbic acid. The three SeNPs investigated in the current study were: (1) chitosan, (CS-SeNPs); (2) 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate coated SeNPs (Ethoxylated-SeNPs) and (3) Hydroxyethyl cellulose; HEC-SeNPs). The efficiency of nanoparticles formation was calculated by ICPMS measurements, after a mass balance of the amount of selenium added and the amount of free selenium obtained after filtering the suspension with a 10 kDa molecular weight cut off filter by applying centrifugation at 400 g for 30 min at room temperature. The best conditions for obtaining spherical SeNPs with an efficiency of formation higher than 95 % were: 0.054 M ascorbic

1
2
3 Acid, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of selenium as selenite and a stabilizer agents concentration of 0.1, 6.5
4 and 0.5 % for Chitosan; 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate and Hydroxyethyl
5 cellulose, respectively at pH 5. Finally, the dispersion was diluted with distilled water up to a
6 final concentration of 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of SeNPs. Synthesized SeNPs were stored at 4 °C up to two
7 months.
8
9
10
11
12

13 14 15 16 **Bacterial Culture and Nanoparticles application**

17
18 The test strain used in this study was *Lactobacillus Bulgaricus* LB-12, which was obtained
19 from F-DVS, Chr. Hansen's Laboratory (Milwaukee, WI, USA). The bacterial culture were
20 grown in MRS broth (Scharlau, Spain) prepared and sterilized according to the manufacturer's
21 instructions. The cultures were incubated at 37 °C for 24, 48 and 72 h in presence of 1 and 10
22 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ as CS- SeNPs, Ethoxylated- SeNPs and HEC-SeNPs. Bacterial cells were
23 harvested, at the selected incubation times, by centrifugation at 5000 rpm for 5 min at 4 °C
24 and washed twice with 1 mL Milli-Q water. The resulting bacteria pellet and culture media
25 were stored at -80 °C prior to analysis. A control group of *L. Bulgaricus* without adding
26 SeNPs was grown in parallel.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Characterization of SeNPs suspensions and SeNPs internalization in bacteria by** 42 **Transmission Electron Microscopy (TEM)**

43
44 Characterization of the synthesized SeNPs was performed by using a high resolution
45 transmission electron microscope (JEOL JEM 2100, USA) equipped with a X-Ray energy
46 dispersive spectroscopy (XEDS) microanalysis composition system (Oxford Inca). Samples
47 for TEM analysis were prepared by evaporating a drop of coated SeNPs onto a 300 mesh
48 lacey carbon copper grid.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Internalization of SeNPs in bacteria was observed after treatment with 1 and 10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{L}^{-1}$. Following exposure, attached bacteria were fixed *in situ* with glutaraldehyde (2.5 % v/v) and p-formaldehyde (4 % v/v) in PBS at 4 °C for 4 h. Bacteria were then washed and stored in PBS at 4 °C overnight. After post-fixation with osmium tetroxide (1 % v/v) for 1 h at room temperature and in the dark, the bacteria were dehydrated in graded ethanol series (from 30 % to 100 % ethanol) and harvested with propylene oxide. Bacteria suspensions were centrifuged at 1500 rpm for 30 seconds and the propylene oxide was removed. The pellets were treated with a mixture of resin:acetone and finally, treated with 100% resin. The resulting blocks were incubated at 65 °C for 48 h until complete embedding. Ultrathin sections were cut, transferred onto copper grids and examined by TEM.

Selenium Analysis

Total Selenium Determination in bacterial cell pellet and culture medium

About 100 mg of SeNPs treated bacterial cell pellet and/or 0.5 mL of culture medium were microwave digested using a 1000 W MSP microwave oven (CEM, Matthews, NC) with 1 mL of concentrated HNO_3 and 0.5 mL of 30% H_2O_2 . The resulting solution was diluted with deionized water and selenium concentration was determined by an Agilent7700-collision/reaction cell ICP-MS (using H_2 collision gas) following operating conditions given in Table 1. Results are expressed as the mean value (standard deviation for $n = 3$).

Selenium species determination in bacterial cell pellet

Selenium species extraction from SeNPs treated bacterial cell pellet was performed by using a two-step enzymatic hydrolysis protocol. First, 500 μL of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Lysozyme (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) solution in TAE Buffer (pH 7.0; Tris 40 mM, Acetic acid 20 mM, EDTA 1mM) were added to 0.050 mg of bacterial cell pellet; the mixture was incubated

during 2.5 h at 37 °C. Next 500 µL of 100 µg·mL⁻¹ protease type XIV (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) solution in TAE buffer were added and sonicated by means of an ultrasonic probe (Sonoplus ultrasonic homogenizer equipped with a 3 mm diameter titanium microtip, Bandenlin, Berlin, Germany) during 50 s at 60 % of ultrasound amplitude. For the analysis of selenium species in the culture media, enzymatic hydrolysis was performed in presence of 500 µL solution of protease type XIV 100 µg·mL⁻¹ in TAE buffer followed by 50 s ultrasonic probe sonication. The extracts from bacterial cell pellet and media were centrifuged at 7500 g for 15 min using 0.22 µm cutoff filter and storage to -80 °C until analysis. Selenium species in the extracts were analyzed by HPLC-ICPMS using an anion exchange chromatography (Hamilton PRP X-100, 150 mm x 4.6 mm, 10 µm, Hamilton, Switzerland) by following the experimental conditions given in Table 1.

Flow Cytometry Assessment of viability of lactic bacteria treated with SeNPs

Measurement of viability of *L. Bulgaricus* in presence of SeNPs and was performed using the fluorescent dyes of the LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit and by following the manufacturer's instructions. *L. Bulgaricus* were treated with 1 and 10 µgSe·mL⁻¹ of Se (in form CS-SeNPs, HEC-SeNPs and Ethoxilated-SeNPs) for 24 and 48 hours and then centrifuged. Then, bacterial cells were washed, resuspended and diluted with NaCl (0.85 % w/v) until to obtain 1x10⁶ bacteria·mL⁻¹ in 1 ml NaCl solution. Aliquots of 1000 µl of this diluted bacterial cell suspension were treated with 1.5 µl of each dye (3.34 mM of Syto 9 dye and 20 mM propidium iodide). Additionally, aliquots of 1000 µl of diluted cell suspension were also treated with SYTO 9 alone and PI alone. The samples were incubated for 15 minutes at room temperature in the dark and immediately examined using cytometry analysis. Flow cytometry analyses were performed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton

Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.) equipped with a 15 mW, 488 nm, air-cooled argon ion laser and a cell-sorting catcher tub.

Results and discussion

Synthesis, characterization and stability of SeNPs

As mentioned earlier, SeNPs were synthesized by chemical reduction of selenite with ascorbic acid in presence of different stabilizers agents (Chitosan, 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylated and Hydroxyethyl cellulose). As shown in figure 1, the sizes and morphologies of the synthesized NPs were characterized by TEM. The morphologies of SeNPs were all spherical, of which sizes were in the range of: 25 ± 5 nm for CS-SeNPs (Figure 1a), 53 ± 6 nm for ethoxylated- SeNPs (Figure 1b) and 101 ± 6 nm for HEC-SeNPs (Figure 1c). The results show that the stabilizers employed modulate the SeNPs in the aspect of diameter allowing us to examine SeNPs toxicity against bacteria from a double aspect: nature of capping agent and diameter size. It is worthwhile mentioning that all the obtained SeNPs dispersions were stable at least for two months either in aqueous solution or in MRS broth media where the bacteria were cultured. NPs stability is a key factor when evaluating toxicity effect. Aggregation of NPs can contribute to modify the effect of NPs on living systems when compared to non-aggregated NPs.

Impact of Size and Coating material of SeNPs effect on *Lactobacillus bulgaricus*

As previously mentioned, research suggests that the shape, size of NPs and capping agent can impact the toxicity of these nanoparticles. The SeNPs investigated were all spherical which excludes particle shape as a contributing factor to toxicity in the current study. The diameter of the investigated SeNPs ranged from 25 nm to 100 nm, size at which nanoparticles exhibit their unique properties. Additionally, the composition of the culture media does not allow the

investigated SeNPs to aggregate which allows for a more accurate toxicity evaluation.

Additionally, the pH of the three SeNPs suspensions tested was fixed to a value of 5.

The toxicity of SeNPs on *Lactobacillus Bulgaricus* was studied by evaluating bacteria growth by optical density at 600 nm (OD_{600}) measurements (Figure 2) and bacteria viability using the LIVE/DEAD BacLight™ kit and flow cytometry analysis (Figure 3). Both assays were performed in absence (control) and presence of SeNPs at two levels of exposure (1 and 10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$). OD_{600} data collected in Figure 2 shown no significant differences in curve growth profile between SeNPs treated- and control bacteria when adding 1 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SeNPs (Figure 2a). Furthermore, the utilized capping agents themselves did not show any effect on bacterial growth at this concentration level. However bacterial growth rate decline when increasing selenium concentration up to 10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$, being this effect significant when supplementing selenium as ethoxylated-SeNPs (Figure 2b). In fact the presence of ethoxylated- SeNPs strongly inhibited bacterial growth. At this step is worth mentioning the role of the capping agents when working at this selenium concentration level. Chitosan and HEC did not have any impact on bacterial growth, suggesting that the bacterial growth decrease observed in presence of SeNPs is due to the HEC-SeNPs or CS- SeNPs themselves rather than the presence of impurities (reducing agent or stabilizer) in the SeNPs solution. However, the presence of the ethoxylated surfactant had a dramatic impact on bacterial growth and therefore in toxicity. As it is shown in Figure 2b both the ethoxylated surfactant itself and the ethoxylated-SeNPs completely inhibit bacterial growth when comparing to control samples. In this case the toxicity of the SeNPs is clearly due to the presence of the impurities (capping agent) in the SeNPs solution at a toxic dose. It is important to note that the 10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ ethoxylated- SeNPs solutions contains a higher concentration of capping agent than the 1 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SeNPs solution. The results obtained by OD_{600} measurements were further confirmed by flow cytometry measurements. Figure 3 shows the percentage of

bacterial cells stained with SYTO 9 (intact cells) and with PI (damaged cells). After 24 and 48 h of exposure (Figure 3a) over 80% of bacteria cells were viable in presence of 1 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$, being independent on the type of SeNPs supplemented and the time of exposure. Additionally, the capping agents themselves did not affect bacterial cell viability. When increasing selenium level of exposure up to 10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 3b) the presence of HEC-SeNPs or CS-SeNPs barely affect the viability of the expose bacterial cells even at an exposure time of 48 h. In contrast, the presence of 10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Se in form of ethoxylated- SeNPs and even in presence of the non-ionic surfactant used as stabilizer during 24h and 48 h of exposure reflects an important decrease of bacterial cell viability, suggesting the surfactant employed in the synthesis of the ethoxylated-coated SeNPs as the main responsible of the drastic decrease in bacterial cell viability when exposed to ethoxylated-SeNPs.

Data reported in the current study demonstrated that several factors must be taken into consideration with regards to establish the true toxicity of SeNPs. First, the potential toxicity of the chemical reagent used as capping agent for stabilising SeNPs suspensions. Concerning to the toxicity observed when exposing *L. Bulgaricus* to ethoxylated- SeNPs, it has been clearly demonstrated that the toxic effects are mainly due to toxicity of the non-ionic surfactant in the SeNPs solution. The results obtained are of importance since in most of research appeared in the literature on NPs toxicity, the influence of the chemical reagent used in preparing NPs is not properly evaluated. It is worth mentioning that the stabilizer employed (2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate, called Surfynol 420) is a non-ionic surfactant which is used in waterborne industrial coatings, internal can coatings, paper coatings and waterborne packaging ink applications involving indirect food contact. Our results shown that surfynol kills *L. Bulgaricus* cells being toxic at this concentration also for a short exposure time.

Other factors affecting NPs toxicity are size effects. Generally speaking, smaller nanoparticles exhibited higher toxicity than the larger ones. However, the presence of HEC-SeNPs (101±6 nm) or CS-SeNP (25±5 nm) in the culture media provides similar effects on bacterial cell growth and bacterial cell viability. Based on these conflicting observations, it appears that particle size was not the dominant factor in determining the toxicity in the current study. Nevertheless, particle size may still influence the toxicity of SeNPs under other testing conditions and/or if NPs with same capping agent but different particle sizes were utilized.

Bacteria uptake, transformation and localization of SeNPs

The degree of cellular internalization is an important factor for understanding the biological mechanisms affected by SeNPs exposure. For this purpose, the concentration of selenium in the culture media and in the bacterial cell pellet of bacteria exposed to 1 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SeNPs was determined by ICP-MS following the procedure described in section 2.1. When dosing with 1 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ accumulation percentages as low as of 10 % and 20 % were obtained by adding selenium as SeNPs, respectively, being these values independent on the time of exposure (24, 48, 72 hours, corresponding at stationary phase of the bacterial culture growth in Figure 2a) and the type of SeNPs applied. However, selenium accumulation drastically increases when increasing selenium level of exposure (10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$) with values of 80, 50 and 30 % for CS- SeNPs (25±5 nm) Figure 1a), for ethoxylated- SeNPs (53±6 nm) and for HEC- SeNPs (101±6 nm), respectively. Selenium accumulation values were independent on the time of incubation: 24h (log phase in Figure 2b) and 48 and 72 h (stationary phase of bacterial culture growth in Figure 2b), suggesting that selenium is mainly accumulated during the log phase recognized as the point where bacteria divided as rapidly as possible. The increase of Se concentration in the pellet was consistent with a progressive decrease in the culture media (data not shown).

Results in figure 4 indicate that the amount of Se accumulated by the bacteria (expresses as percentage of Se found in the bacterial cell pellet respect to selenium added) increases as the SeNP sizes decrease. Therefore, size of SeNPs may influence selenium accumulation by bacteria but may not influence their toxicity under the conditions of the current study. The results obtained suggest that SeNPs size does not play a major role in the behaviour of the SeNPs tested.

Once selenium accumulation was evaluated, selenium species in the bacteria pellet and culture medium were determined by HPLC-ICPMS. First, selenium species were enzymatically extracted using a mixture of enzymes consisting of lysozyme and protease in a buffered media (TAE) and by performing the procedure described in section. The resulting extracts were further analyzed by using anion exchange on line coupled to ICPMS. The chromatograms of selenium species obtained by anion-exchange chromatography corresponding to bacteria grown in presence of the three different SeNPs solutions at 24 h incubation time are shown in figure 5. The main species found in the chromatograms, by comparison of the retention time of the standards and by spiking experiments were SeCys₂, SeMet and inorganic selenium. Data obtained are in agreement with results reported in the literature suggesting the capability of *L. Bulgaricus* to biotransform inorganic selenium into selenium organic compounds.¹¹⁻¹⁵ The selenium speciation results reported in figure 5c and 5d show that the distribution of selenium is remarkably different depending on the SeNPs solution added to the culture media and the level of exposure. In those bacterial grown in presence of 1 µgSe·mL⁻¹ CS- SeNPs, ethoxylated- SeNPs and HEC- SeNPs around a 95 % and 70 % of the total selenium accumulated in the bacterial cell pellet was transformed in the organic species, respectively. In contrast, when bacteria were exposed to 10 µgSe·mL⁻¹ of SeNPs-CS, ethoxylated- SeNPs and HEC-SeNPs around 90, 35 and 10 % of the selenium was found to be present as organic forms, respectively. It is important to mention that SeCys₂ was

the major selenium specie found when treating bacteria with CS-SeNPs. It is well known that the health-promoting properties of Se are due to vital functions of selenoproteins in which selenium is present as selenocysteine, the 21st amino acid. In this line, SeCys is present at the catalytic site of glutathione peroxidase (GPx), a Se-dependent enzyme, which plays a critical role in cellular antioxidant defense systems, detoxifying peroxides, hydroperoxides and reactive oxygen species (ROS), and therefore, preventing cell damage. Therefore, SeCys has been reported to have a higher antioxidant activity than other Se-species.¹⁶⁻¹⁸ In contrast, the presence of 10 $\mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ethoxylated-coated SeNPs in the culture media strongly inhibited the metabolic synthesis of organoselenium compounds, with most of the selenium accumulated as inorganic selenium (90 %). These results are consistent with the dramatic decreases in viability observed in ethoxylated-coated SeNPs exposed cells compared to control cells. Loss of membrane integrity of a bacterial cell reflects the absence of reproductive growth and metabolic activity leading to bacteria death.

The difference in SeNPs transformation found among the SeNPs solution tested may attribute to different bacteria uptake metabolisms. Two basic mechanisms of ions binding have been described in bacteria: bioadsorption (a passive no metabolically mediated binding process of metal to bacteria cell wall) and bioaccumulation (a active metabolic binding proccess in which metal ions pass the cell membrane and accumulate inside the cell).¹⁹ At this point, the degree of SeNPs internalization was evaluated with the aim of getting a deeper insight into the SeNPs uptake mechanisms involved.

Localization of CS-SeNPs by TEM

The degree of cellular internalization is a potential relevant factor for understanding the biological mechanisms affected by SeNPs exposure. TEM was used for bacteria localization of the internalized SeNPs with the purpose of confirming whether or not the SeNPs were

really inside the bacteria or just attached to the membrane. Transmission electron micrographs of control and selenium- treated bacteria are depicted in figure 6. Since no differences in bacterial cells morphology were observed when treating *Lactobacillus* with $1 \mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SeNPs only micrographs of bacterial strains treated with $10 \mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SeNPs are shown.

The figure 6a displays the characteristic bacilli shape (figure 6a) of an unexposed *L. bacillus* with a cell wall of uniform thickness (28 to 35 nm) that consists of an electrondense outer layer and an inner layer resembling unit-membrane structure. Concerning to CS-SeNPs treated bacteria, figure (6b1-6b2) suggests that SeNPs readily enter in the bacteria cells preserving membrane integrity and therefore causing no cellular damage, compared to the controls. These findings are consistent with our previous results from viability assays by fluorescence staining with Syto9/P. In contrast, bacteria cells exposed to HEC-SeNPs and Ethoxylated-SeNPs displayed the most significant ultrastructural changes, including disruption of intracellular components. *L. Bulgaricus* exposed to HEC-SeNPs (figure 6d1-6d2) displayed cytoplasm condensation while keeping cell wall integrity. As it is shown, HEC-SeNPs are mostly attached to the cell wall which may likely due its high particle size (101 ± 6 nm). Only a few HEC-SeNPs might be able to pass through the cell wall and being metabolically transformed into organo Se-compounds, explaining the low amount of Se-organocompounds found (over 35 %). In contrast, the cytotoxic effect of non ionic surfactant on bacteria is highly evident in figure 6c1-c2. TEM micrographs show that, under these conditions, the cell wall is completely disrupted in most of exposed bacteria, leading to bacteria cell death and corroborating both the data from viability assay and the poor rate of ethoxylated- SeNPs biotransformation to organoseleno compounds (10 %).

It appears that the mechanisms of interaction of SeNPs with *L. Bulgaricus* is highly dependent on the capping agent used, and it may involve a combination of both: physical and chemical interaction.^{3,7,16} The results obtained suggest that biosorption plays a major role in

the accumulation of ethoxylated- SeNPs and HEC- SeNPs by the bacteria. NPs are first adsorbed onto the cell wall and then interact with the cellular membrane either without compromising membrane integrity (as HEC- SeNPs) or causing physical damage, that ultimately leads to bacteria death (as ethoxylated- SeNPs). SeNPs are also partially dissolved and non-metabolically transformed into inorganic selenium with the assistance of substances excreted by the bacteria cell wall. Moreover, transformation of SeNPs may also affect the capping agent. The capping agent may be desorbed by the bacteria and may greatly affect the toxicity of SeNPs, being this process of special relevance when applying ethoxylated- SeNPs. The data in the current study suggests that the true toxicity of ethoxylated- SeNPs is mainly due to the capping agent rather than SeNPs themselves.

In contrast, CS-SeNPs are bioaccumulated inside the bacterial cells. CS-SeNPs are first attached to the bacteria cell wall and then pass through the membrane without causing damage. Once inside, SeNPs are metabolically transformed to SeCys, a selenocompound with antioxidant properties which may play an important role in protecting bacteria against the negative effect of ROS. This fact could explain the results obtained in bacteria cell viability.

Conclusions

Many factors can impact the toxicological behaviour of SeNPs. However, the results presented herein demonstrate the importance of the capping agent on the toxicity of SeNPs. The mechanisms of interaction may combine physical and chemical processes. *In vitro* toxicity studies of CS-SeNPs in *L. Bulgaricus* have shown that CS-SeNPs readily enter cells to the cytoplasm and cause a limited cellular damage, being the bacteria cell wall integrity intact. Moreover, around a 90 % of the selenium content found in CS-SeNPs-treated bacteria was metabolically transformed to organic species, with SeCys₂ as the main selenium species.

1
2
3 Unlike CS-SeNPs, a dramatic decrease in *L. Bulgaricus* viability was observed when applied
4
5 ethoxylated- SeNPs. The data obtained suggests that the toxicity of ethoxylated-coated
6
7 SeNPs is mainly governed by the toxicity of the surfactant used for preparing SeNPs. HEC-
8
9 SeNPs were mostly attached to the cell wall which may likely due to its high particle size
10
11 (101±6 nm). As a result, it is in our opinion that capping agent is one of the most important
12
13 factors to be taken into consideration when accurately evaluating the toxicological behaviour
14
15 of SeNPs. Unfortunately, the coating material effect on the toxicological behaviour of NPS is
16
17 either missing or not explicitly mentioned in most of the reported studies.
18
19
20

21 22 23 **Acknowledgment**

24
25 The authors thank to the Complutense University Flow Cytometry Core (ICTS-CNME) for
26
27 technical support. This work was funded by the Spanish Commission of Science and
28
29 Technology (CTQ2011-22732), the Community of Madrid/ FEDER programme (S2013/ABI-
30
31 3028, AVANSECAL-CM).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. J. Fábrega, S.R. Fawcett, J.C. Renshaw and J.R. Lead, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 7285–90.
2. J.E. Skebo, C.M. Grabinski, A.M. Schrand, J.J. Schlager and S.M. Hussain, *Int. J. Toxicol.*, 2007, **26**, 135–41.
3. N. Von Moosa and V.I. Slaveykova, *Nanotoxicology*, 2014, **8**, 605–30.
4. L. Adams, D. Lyon and P. Alvarez, *Water Res.*, 2006, **40**, 3527–32.
5. M.I. Lopez-Heras, M. Palomo and Y. Madrid, *Anal. Bional. Chem.*, 2011, **400**, 1717–27.
6. M. Wang, W. Feng, W. Lu, B. Li, B. Wang and M. Zhu, *Collision Cell. Anal. Chem.*, 2007, **79**, 9128–34.
7. L. Zhang, D. Li and P. Gao, *World J Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **28**, 3381–6.
8. D. Peng, J. Zhang, Q. Liu and E.W. Taylor, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 1457–63.
9. P.A. Tran and T.J. Webster, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 1553–61.
10. S. Xia, L. Chen, and J.Q. Liang, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 2413–17.
11. M.R. Calomme, K. Brandena and D.A. Berghe, *J. Appl. Microbiol.*, 1995, **79**, 331–40.
12. M. Palomo, M.I. Lopez-Heras, C. Cámara and Y. Madrid, *Food Chem.*, 2014, **164**, 371–9.
13. E. Galano, E. Mangiapane, J. Bianga, A. Palmese, E. Pessione and J. Szpunar, *Mol. Cell Proteomics*, 2013, **12**, 2196–204.

14. A. Alzate, B. Cañas, S. Pérez-Munguía, H. Hernández-Mendoza, C. Pérez-Conde, A.M. Gutiérrez and C. Cámara, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 9776–83.
15. A. Alzate, A. Fernández-Fernández, C. Pérez-Conde, A.M. Gutiérrez and C. Cámara, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 8728–36.
16. E.E. Battina and J.L. Brumaghim, *Cell Biochem. Biophys.*, 2009, **55**, 1–23.
17. E.E. Battin, N.R. Perron and J.L. Brumaghim, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 499–01.
18. M.T. Zimmerman, C.A. Bayse, R.R. Ramoutar and J.L. Brumaghim, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **145**, 30–40.
19. J. Mrvčić, D. Stanzer, E. Solic and V. Stehlik-Tomas, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **28**, 2771–82.
20. Y. Bai, Y. Wang, Y. Zhou, W. Li and W. Zhenj, *Mater. Lett.*, 2008, **62**, 2311–14.

Table 1. Operating Conditions for HPLC coupled to ICPMS

Operating Conditions	
ICPMS parameters for Se determination	
RF Power (W)	1550
Plasma gas flow rate (L min ⁻¹)	15.0
Ar auxiliar flow rate (L min ⁻¹)	0.30
Carrier gas flow rate (L min ⁻¹)	0.75
Nebulizer	Slurry
Spray Chamber	Scott
Adquisition mode	Continuos
Isotopes monitored	⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se
Replicates	3
Reaction gas	H ₂
Reaction gas (mLH ₂ /min)	6
AEX chromatographyc parameters	
Column	Hamilton PRP X-100 (150 mm x 4.6 mm, 10 µm)
Mobile phases	Ammonium citrate 10 mM, 2 % MeOH (pH 5.0)
Mode	Isocratic
Flow rate (mL/min)	1
Injection volume (µL)	100

Figure Captions

Figure 1

TEM images and XEDS spectrum of CS-SeNPs (25 ± 5 nm) (Figure 1a), Ethoxilated-SeNPs (53 ± 6 nm) (Figure 1b) and HEC-SeNPs (101 ± 6 nm) (Figure 1c) at pH=5, $T=20 \pm 1$ °C. Black arrows indicate the Se absorption peaks consisting of SeL_α , SeK_α and SeK_β at 1.4, 11.22 and 12.49 keV, respectively.

Figure 2

Effect of SeNPs and selenite on bacteria growth and accumulation. Bacteria growth curve in presence of SeNPs at two levels of exposure a) $1 \mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ and b) $10 \mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$. Data are expressed as mean \pm standard error N=3 replicates.

Figure 3

Percentages of cell viability of *Lactobacillus Bulgaricus* after treatment with SeNPs at two level of exposure a) $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and b) $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of selenium. Data are expressed as mean \pm standard error N=3 replicates.

Figure 4

Selenium accumulation in bacteria in presence of SeNPs at two level of exposure a) $1 \mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ and b) $10 \mu\text{gSe}\cdot\text{mL}^{-1}$ at different times of exposure. Data are expressed as mean \pm standard error N=3 replicates.

Figure 5

Transformation of SeNPs by *Lactobacillus Bulgaricus*. Anion-exchange HPLC-ICP-MS chromatogram of hydrolyzed extracts of bacteria pellet after exposure to a) $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and b)

10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of selenium during 24 h. Percentage of SeNPs biotransformation at two exposure levels c) 1 and d) 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of selenium. Data are expressed as mean \pm standard error N=3 replicates.

Figure 6

Transmission electron micrographs of un-exposed bacteria (a1-2) and exposed bacteria treated with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Se for 48 h, as CS-SeNPs (b1-2), ethoxylated-SeNPs (c1-2) and HEC-SeNPs (d1-2). Red arrows indicate the presence of nanoparticles.

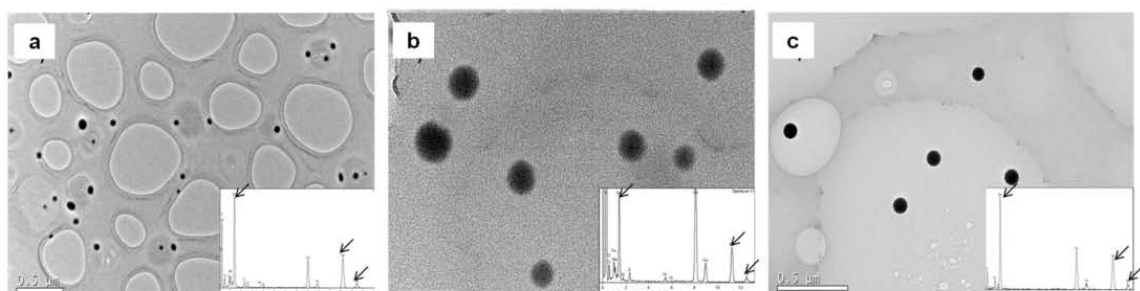


Figure 1

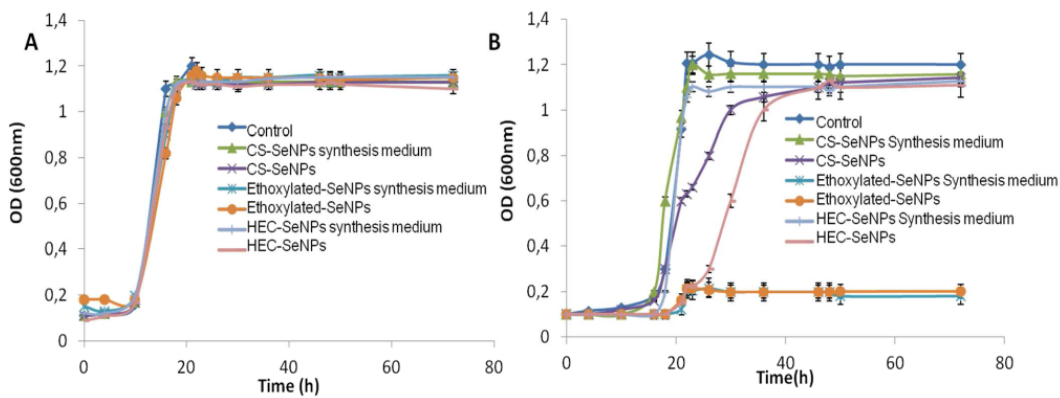


Figure 2

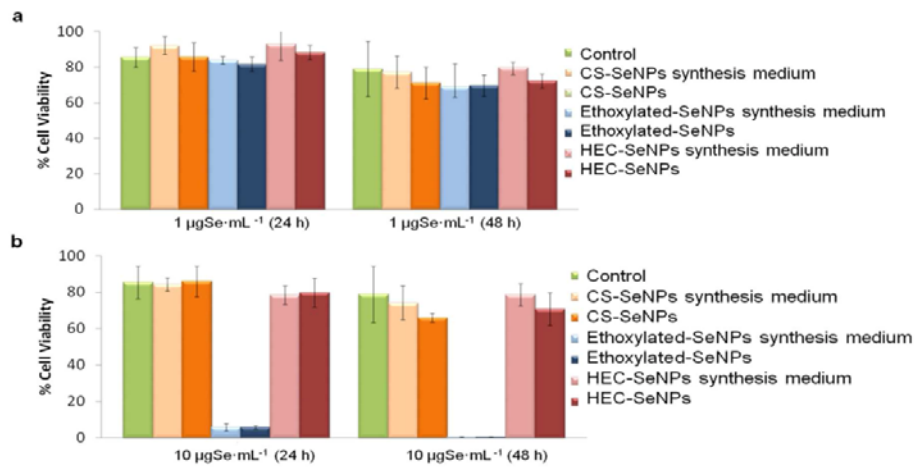


Figure 3

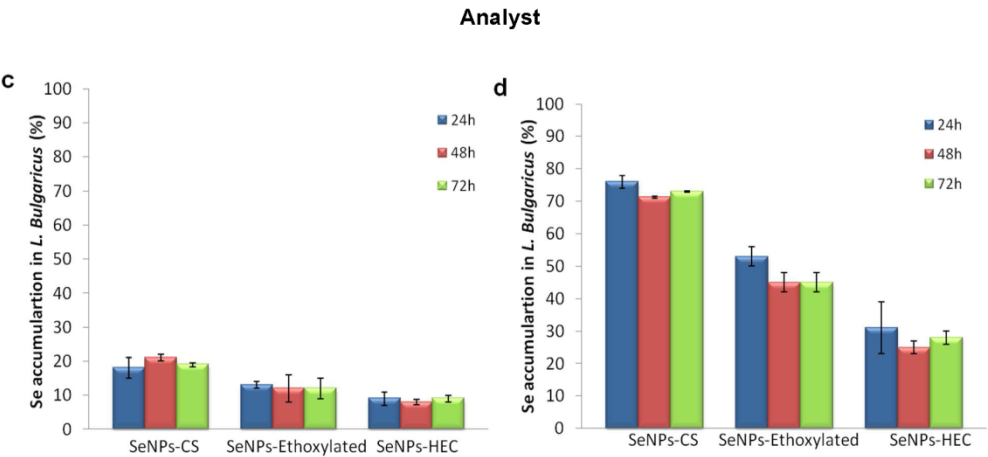


Figure 4

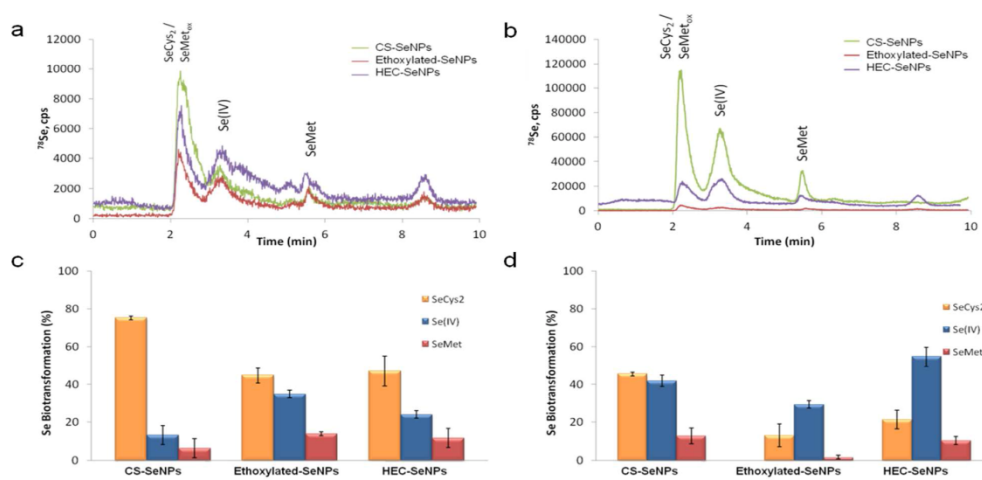


Figure 5

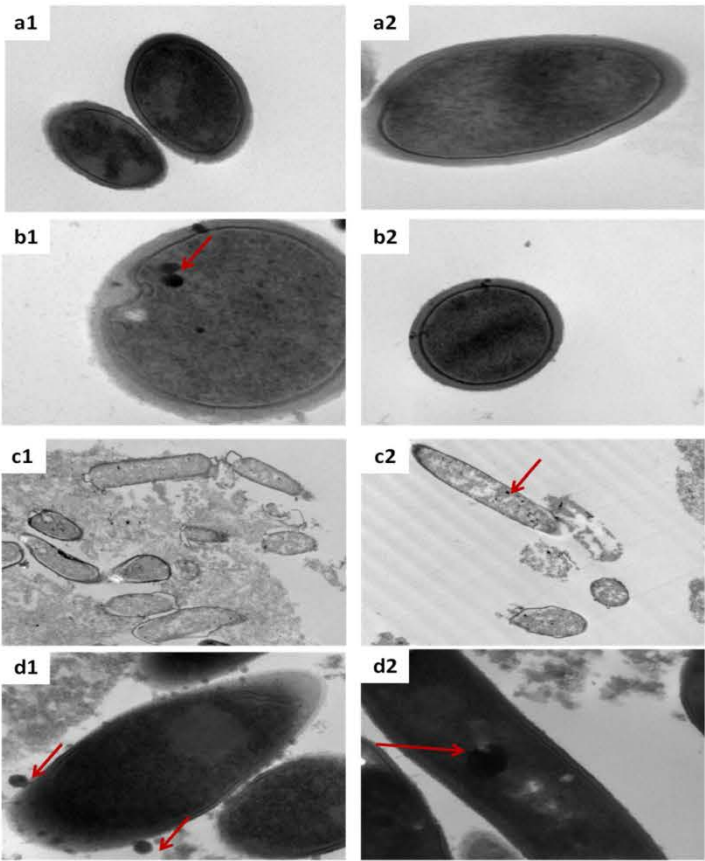
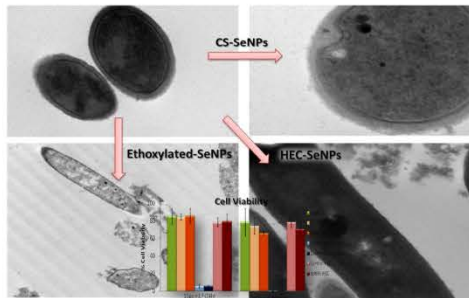


Figure 6



Effect of SeNPs on Lactobacillus Bulgaricus. Evaluation by Transmission Electron Microscopy, Inductively coupled plasma –mass spectrometry and Flow cytometry.

II.3. Acumulación y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio estabilizadas con Chitosan en Rábanos expuestos (*Raphanus Sativus*).

“Accumulation and Biotransformation of Chitosan-modified Selenium Nanoparticles in Exposed Radish (*Raphanus Sativus*)”

Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 30 (2015) 1237

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en:

“XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química” Úbeda, España, Junio 2013. Tipo de Presentación: Comunicación Oral

Accumulation and biotransformation of chitosan-modified selenium nanoparticles in exposed Radish (*Raphanus sativus*).

Maria Palomo-Siguero, Maria Isabel López-Heras, Carmen Cámara and Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.

Abstract.

In this investigation, we evaluate the biotransformation of chitosan- modified SeNPs (CS-SeNPs) in radish plants (*Raphanus sativus*) by using an analytical methodology which combines high performance liquid chromatography (HPLC) and asymmetrical flow field flow fractionation (AF⁴) on line coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), as well as transmission electron microscopy (TEM). CS-SeNPs were synthesized using a solution-phase approach based on the reduction of selenite with ascorbic acid in the presence of chitosan as stabilizer agent. The average diameter of the resulting spherical CS-SeNPs was 26±3nm. Extracts of radish plants exposed to CS-SeNPs were analyzed by HPLC-ICPMS and the results shown that a percentage higher than 95 % of the selenium accumulated was biotransformed in MeSeCys and SeMet. We assume that CS-SeNPs are first adsorbed on the root system and then transformed to organic selenium compounds following a similar metabolic pathway to selenite. Characterization of CS-SeNPs diameter size in radish root system was performed by using both AF⁴-UV-ICPMS and TEM. The size distributions, determined by TEM, were in good agreement with that obtained from AF⁴-ICPMS. The results are of importance since the number of applications of AF⁴-ICPMS to diameter size estimation of nanoparticles in living systems is still scarce. To the best of our knowledge, this is the first report confirming the biotransformation of SeNPs in plants.

*To whom correspondence should be addressed.

Email: ymadrid@quim.ucm.es

1. Introduction

Selenium as a component of seleno amino acids and selenoproteins is essential in important physiological functions: stimulation of the immune system, redox homeostasis and thyroid hormone metabolism. Selenium deficiency has been also associated to a range of diseases, such as muscle and cardiovascular disorders, cancer, and neurological and endocrine function disorders^{1,2}. Moreover, several studies have suggested that some organic forms of selenium could show anticarcinogenic properties against certain types of cancer³. Even though the mechanisms involved in cancer inhibition are still unclear, being tentatively attributed to biological functions of seleno amino acids, such as Se-methylselenocysteine (MeSeCys). However, a higher Se intake than recommended can result in adverse health effects. Therefore, Se has either nutritional function or toxicity depending on its concentration and species. Therefore, how to provide efficient and safe application of dietary selenium supplementation has become a challenge topic in recent years.

Nanotechnology has been touted as the next revolution in many industries, including food processing and packaging. The applications of nano-based technology in food industry may include nano scale vehicles for delivering nutrients and sensitive bioactives, nanoscale films for food packaging and contact materials, nanoscale systems for controlled releasing of fertilizer and pesticides, safety and biosecurity (e.g. nanosensors), and nanotoxicity. Based on these advances, nanotechnology could be also applied for developing selenium nanoparticles as a vehicle for delivering selenium in living systems.

Selenium nanoparticles (SeNPs), which can be considered a novel Se compound, has shown to have excellent antioxidants properties and low toxicity when comparing with other Se-species such as SeMet and MeSeCys. The acute toxicity (LD₅₀) of Nano-Se in mice (92.1 mg Se/kg, 95% confidence limits 71.1–131.1) is significantly lower than that of selenite (15 mg/kg) and SeMet (25.6 mg Se/kg). Selenite and selenomethionine were more active than Nano-Se (36nm averaged diameter size) in increasing serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities, two biomarkers of liver toxicity caused by selenium, as well as in inducing other signs of liver toxicity.⁴ Moreover, it has been reported that SeNPs induce cell cycle arrest in HepG2 cancer cells growth. Data suggest that cell cycle of HepG2 cells is arrested at the S phase by alteration of the eIF3 protein complex expression as result

of Ch-SeNPs exposure, which may hamper translation of mRNAs responsible for encoding proteins important for cell proliferation and oncogenesis ⁵

Most of the studies concerning selenium nanoparticles are mainly focused on the interaction of SeNPs with biological systems, being their potential in food and agriculture less explored. Romero *et al* ⁶ administrate SeNPs enriched- feed to evaluate its further possible use to improve selenium absorption in ruminants. Sodium selenite was encapsulated by nanoprecipitation and emulsion–evaporation methods, within polymeric nanoparticles of Eudragit RL. The high release of ionic selenium from nanoparticles in acid media (pH< 4) suggests a better bioavailability of the element in the small intestine. Uptake, accumulation and biological effects of red nano-size elemental selenium in tobacco callus cultures and rooted tobacco plants were evaluated by Domokos-Szabolcsy *et al* ⁷. SeNPs were produced by *Lactobacillus acidophilus* grown in Selenite enriched medium. The biological effects observed in plant tissues exposed to nanoSe were different than those exposed to selenate. NanoSe (265–530 mM concentration range) stimulated the organogenesis and the growth of root system significantly (40 %).

In the present study, biotransformation of chitosan-modified SeNPs in hydroponic radish plants (*Raphanus sativus*) was investigated by using several analytical methods. Selenium nanoparticles were synthesized using a solution-phase approach based on the reduction of selenite with ascorbic acid in presence of chitosan (CS) as modifier or stabilizer agent. An analytical methodology which combines the use of HPLC and AF⁴ coupled to ICPMS as well as transmission electron microscopy (TEM) was employed to characterize the CS-SeNPs and to establish their accumulation and biotransformation in radish plants. Results obtained were compared with those provide by radish plants hydroponically grown in presence of selenite⁸. The study also evaluates the capability of AF⁴-ICPMS to characterize diameter size of SeNPs in living system. This research will facilitate the understanding of the transformation of nanomaterials and forecasting their fate and toxicity in the environment and biological systems. In summary, it will allow us to evaluate selenium nanoparticles as a way of delivering selenium in food and agriculture areas.

2. Experimental

2.1 Chemicals and instrumentation

All chemicals and reagents used were of analytical grade and solutions were prepared with de-ionized water (18 M Ω cm) obtained from a Milli-Q water purification system unit (Millipore, USA). Stock standard solutions of SeMet, MeSeCys and SeCys₂ (Sigma-Aldrich, Germany), were prepared by dissolving them in 3% hydrochloric acid (37%, Merck, Germany). Inorganic selenium solutions were prepared by dissolving sodium selenite (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄), purchased from Merck, in Milli-Q water. Stock solutions of 1000 mgL⁻¹ were stored at 4 °C, whereas working standard solutions were prepared daily by dilution.

Chitosan polysaccharide and ascorbic acid purchased from Sigma Aldrich and acetic acid from Fluka were used for Chitosan modified-SeNPs synthesis.

Enzymatic hydrolysis was carried out using a non-specific enzyme, Protease XIV from *Streptomyces griseus*. Tris-HCl buffer solution used for species extraction was prepared by Trizma base (Fluka) dissolution in water at pH 7.5 adjusted with HCl.

Selenium species separation by anionic-exchange chromatography was achieved by using 10 mM citric acid (Sigma) in 2% MeOH (99.9%, Scharlau) adjusted to pH 5 with ammonium hydroxide (Fluka) as mobile phase. The mobile phase for Zorbax C8 reversed-phase chromatography was 0.1% trifluoroacetic acid, TFA (Sigma-Aldrich), in 2% MeOH.

A 1000W MSP microwave oven (CEM, Matthews, NC) equipped with temperature and pressure feedback controllers and 12 high pressure vessels of 100 mL inner volume, operating at a maximum power of 1600W was used for microwave acid digestion.

A Sonoplus ultrasonic homogenizer (Bandelin, Berlin, Germany) equipped with a 3-mm diameter titanium microtip fitted with a high-frequency generator of 2200W at a frequency of 20 kHz, and an ultrasonic bath (JP Selecta, Barcelona, Spain), were used to extract the seleno-compounds from the plant tissues

An Agilent 7700-collision/reaction cell ICP-MS (using H₂ collision gas) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was employed for elemental specific detection. HPLC-ICP-MS measurements were carried out using a PU-2089 LC pump (JASCO, Tokyo, Japan) fitted

with a six-port injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohnert Park, CA,) with a 100- μ L injection loop for the chromatographic separations.

Two different chromatographic columns were used: anionic exchange PRP-X100 (250 x 4.1 mm, 10 μ m) (Hamilton, Switzerland) and a reversed-phase ion pairing C8 Zorbax R_x-C₈ (250 x 3.0 mm, 5 μ m) (Agilent, USA). The outlet of the column was connected directly into the conical nebulizer of the ICP-MS with PEEK tubing. The operating parameters are compiled in Table 1.

An asymmetrical flow field flow fractionation (AF⁴) AF2000 system (Postnova Analytik, Landsberg, Germany), equipped with a regenerated cellulose membrane of 10 kDa molecular weight cut-off and a spacer of 500 nm, was used in this study. A loop of 200 μ L was employed to inject the samples into the AF⁴ via a Rheodyne valve. The AF4 channel was connected on-line to a UV detector (Model 1260 Infinity; Agilent Technologies) and to an ICPMS. The optimized AF⁴ settings and flows used for the separations, and the UV and ICPMS detection operating conditions are detailed in Table 1. The AF⁴ system was also calibrated for molecular diameter size determination by using polystyrene latex (PSL) beads reference standards of three known sizes (22, 54 and 100 nm).

Characterization of the synthesized CSSeNPs was performed by using a high resolution transmission electron microscope (JEOL JEM 2100, USA) equipped with a X-Ray energy dispersive spectroscopy (XEDS) microanalysis composition system (Oxford Inca). Samples for TEM analysis were prepared by evaporating a drop of chitosan-modified SeNPs or a drop of radish extracts onto a 300 mesh lacey carbon copper grid.

2.2. Synthesis of chitosan-modified selenium nanoparticles

Chitosan modified-SeNPs (CS-SeNPs) were prepared according to the procedure described by Bay *et al*⁹. Firstly, aqueous chitosan solutions within the concentration range from 0.01 to 0.5% (w/v) were prepared in 3% (w/v) acetic acid solution. Then, ascorbic acid was added dropwise into chitosan-acetic acid mixture and magnetically stirred for about 30 minutes at room temperature. After that, sodium selenite was slowly added to the chitosan-acetic acid mixture and stirred for 30 minutes. Finally the dispersion was diluted to 100

mL with distilled water obtaining a final concentration of 200 mg L⁻¹ of chitosan-modified selenium nanoparticles. Synthesized CS-SeNPs were stored at 4°C up to two months.

The efficiency of nanoparticles formation was calculated by ICPMS measurements, after a mass balance of the amount of selenium added and the amount of free selenium obtained after filtering the suspension with a 10kDa molecular weight cut off filter by applying centrifugation at 400g for 30 min at room temperature.

2.3 Plant Growth and Samples.

Experiments were conducted in a greenhouse under controlled conditions of temperature and light. Seeds of radish (*R. sativus*) were germinated in darkness at 25°C on filter paper moistened with water in Petri dishes. After 5 days- germination, seedlings were transferred to 300 mL plastic vessels with modified Hoagland's nutrient solution (0.1strength and pH 5.6) containing: 0.2M KH₂PO₄; 1M KNO₃; 0.8M Ca(NO₃)₂·4H₂O; 0.4M MnSO₄·7H₂O, 0.02M Fe-EDDHA; 0.02M H₃BO₃; 0.004 MnSO₄·5H₂O; 0.0004M ZnSO₄·7H₂O; 0.0004 CuSO₄·5H₂O; 0.0002M Na₂MoO₄·2H₂O, using perlite as substrate during 2 weeks. Afterwards, Selenium as selenite and SeNPs (1 mg L⁻¹ each) were added to the vessels, and solutions were renewed every 3 days for 40 days, until the cycle of the plants was completed. A control group of plants without adding selenium was grown in parallel. Then, plants were harvested and washed with de-ionized water. Radish samples were chopped and stored at 4°C before analysis.

2.4 Selenium Analysis

2.4.1. Total Selenium Determination. About 250 mg of fresh radish sample were microwave digested with 2.5 mL of concentrated HNO₃ and 1 mL of 30% hydrogen peroxide to determine the total selenium content. The resulting solution was diluted to 25 mL with deionized water and selenium concentration was determined by ICP-MS following operating conditions given in Table 1. Results are expressed as the mean value (standard deviation for *n* =3).

2.4.2. Selenium species determination. Selenium species extraction from 250 mg of fresh radish samples was performed by using enzymatic probe sonication⁸ after adding 3 mL of de-ionized water and 10 mg of Protease XIV. The extracts were centrifuged at 7500g for 30 min using a 10 kDa cutoff filter. The extracts were analyzed by HPLC-ICPMS using two

different chromatographic separation mechanisms: anion exchange chromatography and reversed-phase chromatography and by following the experimental conditions given in Table 1. Recovery of the selenium compounds on the column was evaluated using column switching on the HPLC set up in a flow injection mode. To determine the column recovery of the injected selenium compound standards, the flow injection peak areas obtained were compared with the peak areas of the chromatogram. Selenium species concentration was determined by monitoring ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , and ^{80}Se isotopes using the standard addition method.

Method accuracy was evaluated by using an enriched wheat flour reference material (ERM BC210a), certified for selenium ($17.23 \pm 0.91 \mu\text{g g}^{-1}$) and selenomethionine content ($27.4 \pm 2.6 \mu\text{g g}^{-1}$), from LGC (United Kingdom)

2.4.3. AF⁴-UV-ICPMS and TEM detection of chitosan modified- selenium nanoparticles in radish root system. CS-SeNPs were extracted from the radish root system by using the medium employed in the CS-SeNPs synthesis (0.1% Chitosan, 0.034M Ascorbic acid, 0.24M Acetic acid) as extracting solution. To about 200 mg of fresh radish samples, 1mL of extracting solution were added and followed by 30 min of sonication in an ultrasonic bath. The resulting extracts were centrifuged at 10000rpm for 10 min and analyzed by TEM and X-Ray Energy Dispersive Spectroscopy (XEDS) for the microanalysis composition. Supernatants were also analyzed by AF⁴-UV-ICPMS following the operational conditions detailed in Table 1.

3. Results and discussion.

3.1 Synthesis of chitosan-modified selenium nanoparticles.

Radish plants were hydroponically grown in presence of Chitosan-modified SeNPs. Nanoparticles were synthesized in the laboratory through the reduction of selenite with ascorbic acid using chitosan as stabilizer. The method is based on those reported by Bay *et al*⁹ and Zang *et al*¹⁰ where water-soluble polysaccharides (chitosan, konjac glucomannan, carboxymethyl cellulose, and acacia gum) were used as modifiers or stabilizers of SeNPs. The resulting SeNPs suspensions were stable up to 6 months of storage. We evaluated the following experimental parameters: chitosan concentration, ascorbic concentration and initial

pH value of chitosan solution. Optimization was performed by applying a univariate approach. Several Chitosan (0.01 – 0.5% (w/v)) and ascorbic acid (0.027M, 0.054M, 0.108M, 0.27M and 0.34M) concentrations were tested for preparing CS-SeNPs. The best conditions for obtaining spherical CS-SeNPs with an efficiency of formation (calculated as indicated in section 2.2) higher than 95% were: 0.1% chitosan, 0.034M ascorbic acid, 0.24M acetic acid and pH=5.

pH-value results to be one of the most relevant parameters when using chitosan. Chitosan with a pKa of 6.3 is polycationic when dissolved in acid and presents NH_3^+ sites. It is expected that the pH of the chitosan solution would play a significant role. Results shown in Fig. 1A revealed that the smallest CS-SeNPs were obtained when the synthesis pH decreases from 6 to 3. At $\text{pH} \geq \text{pKa}$, SeNPs begun to aggregate as it is shown in TEM images in Fig. 1B.

Diameter and shape of the synthesized NPs was measured by using TEM. The term particle sizes in this paper refer to the average diameter of the CS-SeNPs. The average diameter of the spherical CS-SeNPs was determined based on the diameter of about a hundred particles from the TEM micrographs for each sample. SeNPs with an average diameter of $25 \pm 5 \text{ nm}$ were obtained under these conditions according to transmission electron microscopy results

3.3. CS-SeNPs accumulation and biotransformation in Se-enriched radish.

Accumulation and biotransformation of selenium by plants have been reported in several papers.^{1,8,11} Many *Allium* (*Allium cepa* L., *Allium sativum* L., *Allium schoenoprasum* L., etc.) and *Cruciferae* species (*Brassica juncea* and *Brassica oleracea*) have been the subject of several studies as they are able to incorporate high quantities of selenium and to produce seleno amino acids, which are potentially bioactive for nutrition purposes and phytoremediation. Most of published scientific research papers involved selenite and/or seleniate as sources of selenium. In general a low transformation of selenium into organic forms is observed in plants grown in Se(VI)-enriched culture media. On the contrary, in those plants exposed to selenite, most of selenium added is transformed into seleno amino acids. Some of the organic compounds identified in different plants tissues are: selenomethionine, selenocystine, γ -glutamyl selenomethylselenocystine, selenomethyl selenocysteine, selenocystathione, selenohomocysteine and selenomethylselenomethionine. Both selenocysteine and selenomethionine can be incorporated into the proteins, which can leads

to phytotoxicity. However, selenomethylselenocysteine is a non-proteinogenic seleno amino acid, which has been identified in plants that exhibit a quite tolerance to selenium.

As abovementioned, all studies have been conducted in plants hydroponically grown in Se(IV) and Se(VI)-enriched media but few data about SeNPs accumulation and transformation in plant systems is available in the literature. With the aim of gaining a deeper insight into how SeNPs are accumulated and biotransformed in plants, radish plants were hydroponically grown in presence of CS-SeNPs and selenite, for comparison purposes. Radishes (*Raphanus sativus*) were selected as being one of the commonest of garden vegetables because of the ease and rapidity with which crop may be obtained. Afterwards, the resulting plants were analyzed by ICPMS for the quantitative determination of total selenium, by HPLC-ICPMS for the identification and determination of selenium species and by AF⁴-UV-ICPMS for the size characterization of CS-SeNPs in the root system. The ICPMS and HPLC-ICPMS methods were validated by using an enriched wheat flour reference material (ERM BC210a), certified for selenium ($17.23 \pm 0.91 \mu\text{g g}^{-1}$) and SeMet ($27.4 \pm 2.6 \mu\text{g g}^{-1}$). Because, at 95 % confidence, no significant differences were observed between the certified value and the experimental ones, the method was believed accurate for total selenium determination and selenium speciation, respectively.

Total selenium concentration found in radish hydroponically grown in selenium-enriched media was: 207 ± 2 and $144 \pm 4 \mu\text{g Se g}^{-1}$ when supplementing Se as selenite or as selenium nanoparticles, respectively. Selenium accumulation was a 25% higher in those plants grown in selenite. No perceptible symptoms of toxicity were detected in plants grown in both selenite and CS-SeNPs media. Once selenium accumulation was evaluated, selenium species were extracted by means of an enzymatic treatment using ultrasound probe sonication (USP) following the procedure detailed in the experimental section. The resulting extracts were further analyzed by using two separation mechanisms: anion exchange and reversed phase chromatography on line coupled to ICPMS. In terms of recovery for the column, all of the selenium was quantitatively recovered (100 ± 4) from the injection of selenium species standards. The chromatograms of selenium species obtained by anion-exchange and reversed phase chromatography corresponding to radish grown in presence of selenite and CS-SeNPs are shown in Fig. 2. The main species found in the chromatograms, by comparison of the retention time of the standards and by spiking experiments were MeSeCys and SeMet. The chromatograms profiles obtained from radish extracts were independent on the chemical form in which selenium was supplemented to radish plants. Quantification of Selenium species

was performed by using HPLC-ICPMS. Table 2 shows the concentration of Se-species and the fraction of total selenium (calculated as the sum of selenium in separated Se species relative to the total Se extracted. Recovery values ranged from 95 to 100%, suggesting CS-SeNPs transformation to organic selenium compounds once CS-SeNPs has been taken by radish plants and by following a similar metabolic pathway to selenite. The most likely reason for the high CS-SeNPs tolerance observed in these plants is the formation of MeSeCys a non proteinogenic seleno amino acid linked with selenium detoxification processes in plants.

3.4. Characterization of CS-SeNPs in radish root system by AF⁴-UV-ICPMS and TEM.

As CS-SeNPs was not detected inside radish, it can be hypothesized that the CS-SeNPs could be transformed on/ in the root surface. Radishes present a tap root system structure which is made up of a central large root that is called the taproot (the edible part) and lateral roots (smaller in diameter than the taproot), which originate from the pericycle, branch off from the taproot, and subsequent lateral roots can branch off other lateral roots. With the aim of gaining a deeper insight in CS-SeNPs metabolic pathway, the presence of CS-SeNPs on the surface of the taproot (the edible part) and lateral roots of the radish plants was evaluated by TEM measurements after extracting SeNPs from radish roots by using the medium previously employed for the synthesis of CS-SeNPs (0.1% Chitosan, 0.034M Ascorbic acid, 0.24M Acetic acid) as extracting solution. TEM images of CS-SeNPs extracted from lateral roots (Fig.3A) show the presence of spherical selenium nanoparticles with a particle diameter estimated of 25 ± 8 nm. However, TEM images of CS-SeNPs extracted from taproot (Fig. 3B) shows that particles are mainly interconnected, assembled or aggregated. XEDS analysis of the selected regions confirms the presence of selenium in particles composition. The results suggest that CS-SeNPs begins to aggregate on the tap root surface and then transformed into selenium organic species in taproot.

Once size and morphology of CS-SeNPs was studied by TEM, the capability of AF⁴ on line coupled to UV and ICPMS for determining CS-SeNPs size in the root system of the radish was evaluated. The optimized AF⁴ settings and flows used for nanoparticles fractionation and the UV and ICPMS detection operating conditions are detailed in Table 1. Under these separation conditions, the recovery of the fractionation method was calculated following an on-line approach where sample is injected both with and without applying a cross-flow field.

Afterwards, the area under each peak is integrated, and the difference represents the analyte mass loss in the channel. In our case, the recovery was set at $R(\%) \approx 95 \pm 5$.

To date obtaining adequate information on NPs sizes is still an important issue in AF⁴ analysis. It is known that the separation of NPs in AF⁴ channel occurs according to their diffusion coefficient which can in turn be related to the hydrodynamic particle size or molecular weight. Different strategies have been proposed to determine the hydrodynamic diameter of fractionated particles, such as by applying FFF theory or by using certified standards in size to “calibrate” the retention time-size dependence for a specific set of flow conditions. Both approaches entail that size fractionation is only dependent on the size of the component but independent of its chemistry. However, erroneous information may still be obtained since these calibration methods do not take into account elution time changes due to specific NP-membrane interactions, different behavior between the NPs used for calibration and the analyte, formation of aggregates and nature of the nanoparticles^{12,13}. Recently, Gigaut *et al*¹⁴ have shown the influence of the core NP material nature on the retention process in the AF⁴ channel. For the same size, it appears that the retention time increases with the bulk or core density of NPs (Au Ag). However, this effect was not observed for nominally size-matched low density materials such as PLS and SeNPs which appeared in the fractogram at a similar retention time. Based on that, we developed a size calibration procedure using polystyrene latex beads reference standards of three known sizes (22, 54 and 100 nm) (Fig.4A). The equation obtained for the calibration was: diameter (nm)= 2,073 $t_r(\text{min})$ + 9,893 and the correlation coefficient (r^2) was 0.9932 which was considered suitable for AF⁴ calibration. Before applying the equation to estimate CS-SeNPs diameter size in the radish root system, the method was tested to determine the size of the synthesized CS-SeNPs. The size was estimated to be 26±3nm (Fig. 4B) which indicates good agreement with the values provided by TEM (25±5nm) measurements.

The root extracts containing CS-SeNPs were injected into the AF⁴-UV-ICPMS system and analyzed by using the previously optimized separation conditions. Fractograms obtained are shown in Fig. 5. In case of lateral roots (Fig. 5A), the fractogram shows 2 peaks at retention time of 7.1 and 8.7min corresponding to an estimated diameter (based on polystyrene latex beads reference standards retention time) of 29±4 and 33 ±6 nm, respectively. These results are in agreement with those provided by using TEM (25±8nm). On the other hand, in taproot extract where selenium is present as isolated and aggregated CS-SeNP, two peaks were obtained in the fractogram (Fig. 5B). The first peak appeared at 5-6,5 minutes and may correspond to isolated CS-SeNPs with an estimated diameter (based on polystyrene latex

beads reference standards retention time) of 26 ± 3 nm which is in agreement with the results obtained by TEM. The second peak appeared at 17-28 min, it was quite broad and could correspond to aggregated CS-SeNPs with an estimated hydrodynamic diameter of 55 nm. However, sometimes, elution times provided by AF⁴ cannot be associated with the real size of the NPs, e.g., especially when NPs are aggregated.

Very few references exist on NPs transformations in plants. Biotransformation is a critical factor that may modify the toxicity, behavior, and fate of engineered nanoparticles in the environment. In the case of ZnO NPs, results revealed that Zn was found inside the soybean plant only as Zn²⁺¹⁵. Stampoulis *et al.*¹⁶ reported that Ag was found at a greater concentration in zucchini grown in Ag NPs than those cultivated in Ag bulk solution, no test was done to determine whether the Ag, existed as NPs. Yin *et al.*¹⁷ found that the silver speciation in the roots of Ag NPs exposed *Lolium multiflorum* was oxidized to Ag(I). Zhan *et al.*¹⁸ report transformation of the high stable CeO₂ NPs in the cucumber plants. The authors speculate that CeO₂ NPs were first absorbed on the root surfaces and partially dissolved with the assistance of the organic acids (citric acid) and reducing substances (ascorbic acid) excreted by the roots. From the results obtained in the present work we can assume that CS-SeNPs are once dissolved and transformed into inorganic selenium, and then, metabolized to organic selenium compounds following a similar metabolic pathway to selenite.

4. Conclusions

Results shown that the stable CS-SeNPs are biotransformed in exposed radish being a percentage higher 95% of CS-SeNPs applied biotransformed into MetSeCyst and SeMet. Similar results were obtained when selenium was supplemented as selenite which allow us to think that transformation occurs in the same manner. TEM images from the root radish system revealed the presence of CS-SeNPs on root systems, suggesting selenium transformation takes place inside radish. The size distributions of CS-SeNPs in root radish system, determined by TEM, were in good agreement with that obtained from AF⁴-ICPMS. These results are of importance since the number of applications of AF⁴-ICPMS to size characterization of NPs in living systems is scarce. Results presented in this manuscript highlight the importance of the biological system in the transformation of nanoparticles. The modification of nanoparticles in the transformation will not only change their fate and

toxicity, but also may cause dysfunction of their beneficial application such as delivery system.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2011-22732), the Community of Madrid/ FEDER programme (S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM) and the UE/ FEDER Interreg Project Orque Sudoe. (Ref: SOE3/P2/F591) for funding.

References

1. Z. Pedrero and Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **634**, 135-152
2. MI Lopez-Heras, M. Palomo and Y. Madrid, *Anal. Bional. Chem.*, 2011, **400**, 1717-1727.
- 3 M.I. Jackson and G.F. Jr Combs, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* , 2008, **11**, 718-726.
4. J. Zhang, X. Wang and T. Xu, *Toxicol. Scie.*, 2008,**101**, 22-31.
- 5 I. Lopez-Heras, R. Sanchez-Diaz, D. S. Anunciação, Y. Madrid, J. L. Luque-Garcia and C. Camara. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 2014, **5**, 226.
- 6 A. Romero-Pérez , E. García-García , A. Zavaleta-Mancera J. E. Ramírez-Bribiesca , A. Revilla-Vázquez, L. M. Hernández-Calva , Raquel López-Arellano and R. G. Cruz-Monterrosa. *Vet Res Commun* , 2010, **34**,71-79.
- 7 E. Domokos-Szabolcsy, L. Marton, A. Sztrik, B. Babka, J. Prokisch, and M. Fari. *Plant Growth Regul.*, 2012, **68**, 525-531.
- 8 Z. Pedrero, Y. Madrid and C. Cámara, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 2412-17.
- 9 Y. Bai, Y. Wang, W. Zhou, Li and W. Zheng, *Material Letters*, 2008, **62**, 2311-2314.
- 10 Z. Sheng-Yi, Z. Juan, W. Hong-Yan and C. Hong-Yuan. *Materials Letters*, 2004, **58**, 2590- 2594
11. MM. Seppänen, J. Kontturi, I. Lopez- Heras, Y. Madrid, C. Camara and H. Hartikainen. *Plant. Soil*, 2010, **337**, 273-283.

- 12 A. Ulrich, S. Losert, N. Bendixen, A. Al –Kattan, H. Hagendorfer, B. Nowack, C. Adlhart, J. Ebert, M. Lattuadæ and K.J.Hungerbuhler. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 2012, **27**, 1120–1130.
- 13 I. López-Heras, Y. Madrid and C. Cámara, *Talanta*, 2014, **124**, 71–78.
- 14 J. Gigault and V. A. Hackley. *Anal and Bional. Chem.*, 2013, **405**, 6251–6258.
- 15 M.L. López-Moreno, G. De La Rosa, J.A. Hernandez-Viezcas, H. Castillo-Michel, C.E. Botez, J.R. Peralta- Videá and J.L. Gardea-Torresdey, *Environ Sci Technol.*, 2010, **44**, 7315–7320.
- 16 D. Stampoulis, S.K. Sinha and J.C. White. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 9473–9479.
- 17 L.Yin, Y. Cheng, B. Espinasse, B. P. Colman, M. Auffan, M. Wiesner, J. Rose, J. Liu and E. S. Bernhardt. *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 2360–2367.
- 18 P. Zhang, Y. Ma, Z. Zhang, X. He, J. Zhang, Z. Guo, R. Tai, Y. Zhao, and Z. Cha. *ACS Nano*, 2012, **6**, 9943–9950.

Table 1 Operating Conditions for HPLC and A4F coupled to ICPMS

Operating Conditions	
ICPMS parameters	
RF Power (W)	1550
Plasma gas flow rate (L min ⁻¹)	15.0
Ar auxiliar flow rate (L min ⁻¹)	0.30
Carrier gas flow rate (L min ⁻¹)	0.75
Nebulizer	Conikal
Spray Chamber	Scott
Adquisition mode	Continuos
Isotopes monitored	⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se
Replicates	3
Reaction gas	H ₂
Reaction gas (mL H ₂ min ⁻¹)	6
AEX chromatographic parameters	
Column	Hamilton PRP X-100 (150mmx4.6mm, 10µm)
Mobile phases	Ammonium citrate 10mM, 2%MeOH (pH 5.0)
Mode	Isocratic
Flow rate (mL min ⁻¹)	1
Injection volume (µL)	100
RP chromatographic parameters	
Column	Zorbax C8 (250 x 4.60 mm, 5µm)
Mobile phases	2% MeOH, 0.1% TFA (pH 2.2)
Mode	Isocratic
Flow rate (mL min ⁻¹)	1
Injection volume (µL)	100
AF4 separation parameters	

Membrane	Cellulose regenerated (10kDa Cut-off filter)
Spacer (nm)	500
Mobile phases	Water
Injection flow (mL min ⁻¹)	0.1
Injection time (min)	2
Cross flow (mL min ⁻¹)	2
Gradient mode	Power (Exponential 0.5)
Injection volume (μL)	200
Wavelength (nm)	369

Table 2 Concentration ($\mu\text{g Se g}^{-1}$) of selenium-species contained in control and Se-enriched radish.

Sample	MeSeCys $\bar{x} \pm s^a$ ($\mu\text{g Se g}^{-1}$)	MeSeCys R (%) ^b	SeMet, $\bar{x} \pm s^a$ ($\mu\text{g Se g}^{-1}$)	SeMet, R (%) ^b	SeOMet, $\bar{x} \pm s^a$ ($\mu\text{g Se g}^{-1}$)	SeOMet, R (%) ^b	Fraction of Total selenium
Anion exchange chromatography-ICPMS							
Control	0.221 \pm 0.001	21.6 \pm 0.5	0.557 \pm 0.008	54.4 \pm 0.9	0.25 \pm 0.02	24 \pm 1	
Se(IV) treated- radish	72.29 \pm 0.02	64.2 \pm 0.2	32.2 \pm 0.4	28.6 \pm 0.5	8.1 \pm 0.8	7.2 \pm 0.7	103 \pm 4
CS-SeNPs treated- radish	43 \pm 1	55.3 \pm 0.1	27 \pm 1	35.2 \pm 0.5	7.3 \pm 0.5	9.5 \pm 0.6	91 \pm 4
Reversed phase chromatography_ICPMS							
Control	0.70 \pm 0.02	66 \pm 1	0.264 \pm 0.002	26.3 \pm 0.2	0.1 \pm 0.01	7.8 \pm 0.3	
Se(IV) treated- radish	47 \pm 1	70 \pm 1	16.5 \pm 0.3	24.9 \pm 0.4	2.94 \pm 0.06	4.4 \pm 0.2	99 \pm 3
CS-SeNPs treated- radish	35.1 \pm 0.5	67.3 \pm 1	14.2 \pm 0.3	27.2 \pm 0.6	2.9 \pm 0.3	5.5 \pm 0.5	97 \pm 4

^a Average value \pm standard deviation (n=3)

^b Distribution of Se species. R(%) denotes the ratio of Se species concentration to total selenium extracted

^c The fraction of total Se (%) denotes the ratio of the sum of Se species concentrations to total selenium extracted.

In terms of recovery for the column, all of the selenium was quantitatively recovered (100 \pm 4) from the injection of selenium species standard

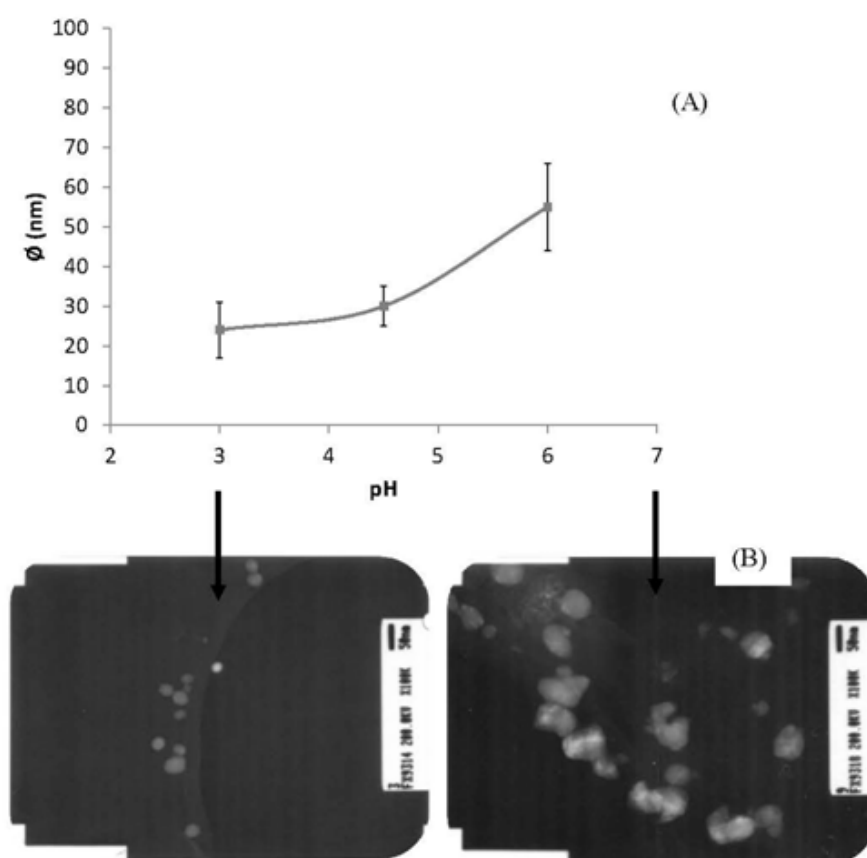


Figure 1

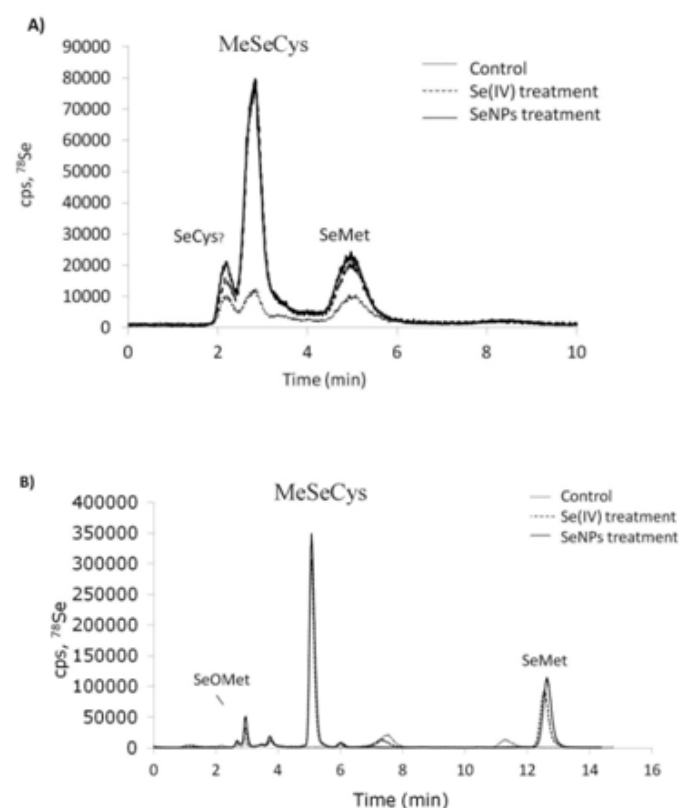


Figure 2

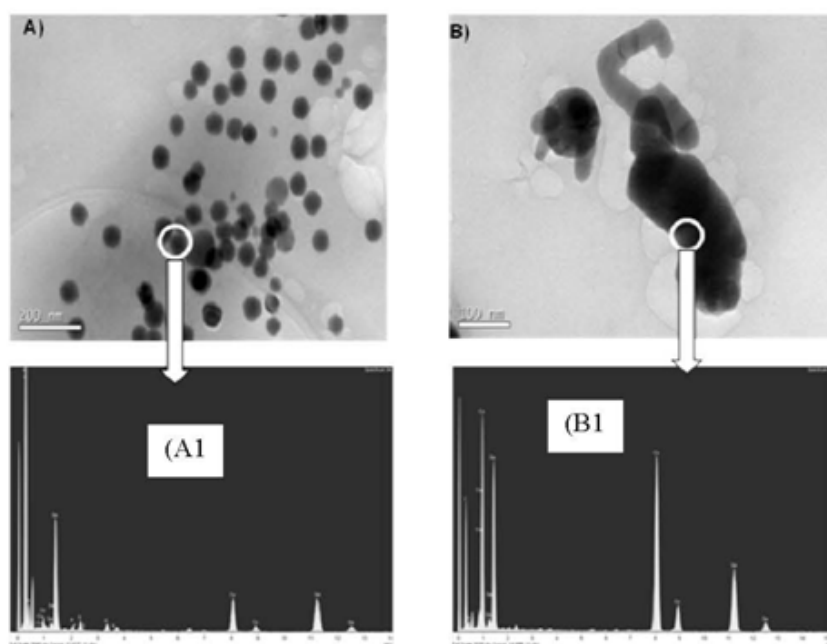


Figure 3

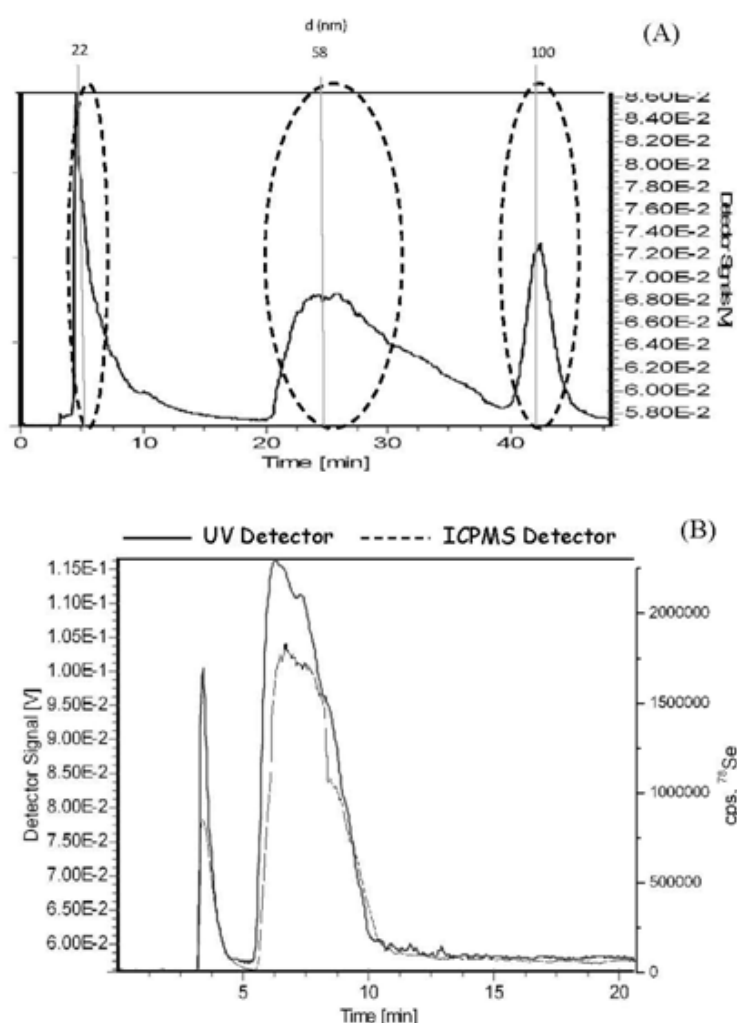


Figure 4

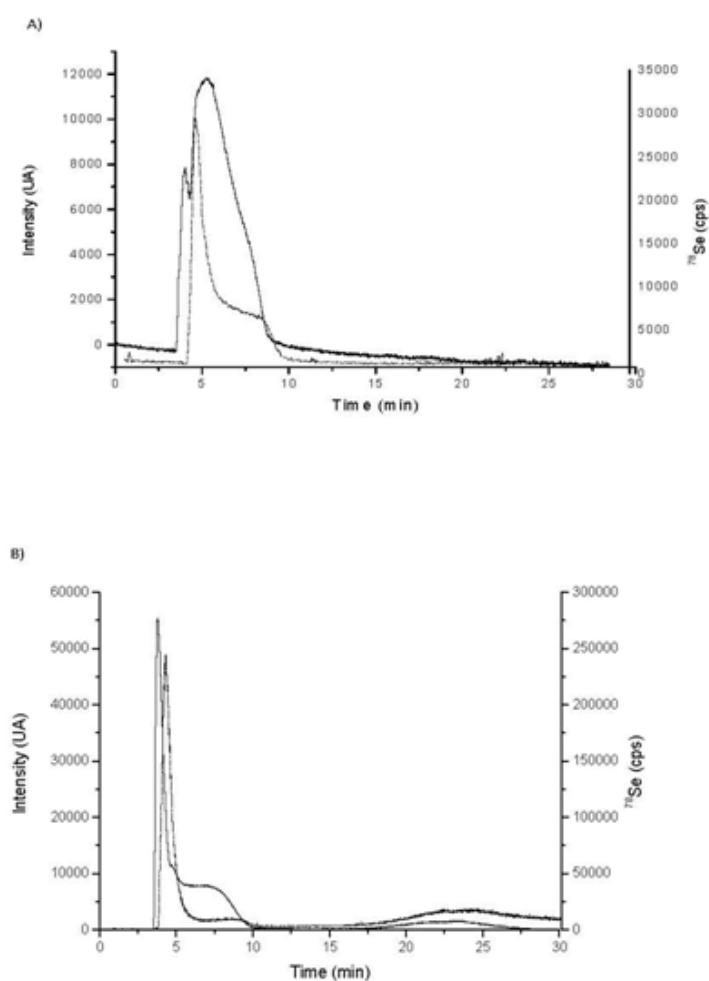
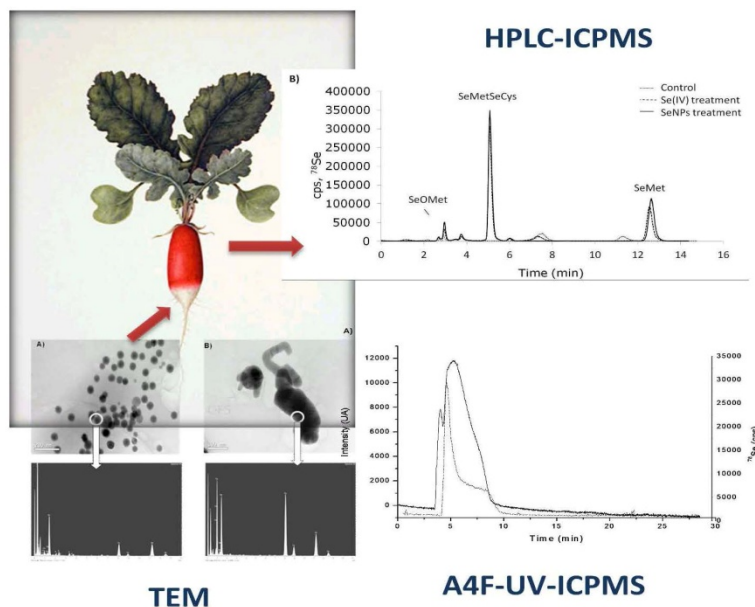


Figure 5



Biotransformation of chitosan- modified SeNPs (CS-SeNPs) in radish plants (*Raphanus sativus*) was performed by using an analytical methodology which combines high performance liquid chromatography (HPLC) and asymmetrical field flow fractionation (A4F) on line coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) as well as transmission electron microscopy (TEM).

Capítulo III.

Desarrollo de Nuevos Envases Alimentarios e Incorporación de Nanopartículas de Selenio con Capacidad Antioxidante

Los cambios en la producción, distribución y almacenaje de los alimentos, requiere el desarrollo de nuevos materiales que permitan preservar el alimento durante el mayor tiempo posible, incrementando su durabilidad. Una estrategia para alcanzar este objetivo es el empleo de los denominados envases activos por la presencia en los mismos de componentes con características antioxidantes y/o antimicrobianas. Como se ha comentado en la Introducción de esta memoria, una de las aplicaciones de las NPs es su incorporación a los envases por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. En esta línea se han desarrollado envases que incorporan AgNPs y ZnONPs por sus propiedades antimicrobianas, TiO_2 NPs por su capacidad de bloquear la radiación UV. Muchos de estos nuevos materiales están disponibles comercialmente en China, Corea y Estados Unidos. En Europa el Reglamento de la UE 10/2011 sobre envases alimentarios no permite en la actualidad el empleo de materiales que contengan nanopartículas y que estén en contacto directo con el alimento, quedando restringido este uso al empleo de nitrato de Titanio.

Por todo ello, se estudió la posibilidad de preparar materiales antioxidantes para la conservación de alimentos que incorporaran SeNPs en su composición. Debido a que la legislación europea prohíbe que las NPs estén en contacto directo con el alimento envasado, las SeNPs fueron incorporadas al material adhesivo que se emplea en sistema multicapas que conforman un envase flexible. Dicha composición adhesiva presenta la ventaja técnica de que es altamente eficaz, es decir, ofrece una capacidad dual tanto adhesiva como antioxidante, consiguiendo que el envase final pueda prescindir de ciertas capas y lo más importante, que no exista migración de partículas de selenio ya que dicha composición adhesiva se encuentra entre capas.

El desarrollo de un nuevo material que incorpora SeNPs en su composición requiere, una síntesis controlada de suspensiones estables de SeNPs, establecer la capacidad antioxidante del adhesivo una vez incorporadas las SeNPs y evaluar la posible migración de las mismas desde el envase al producto en su interior, para asegurar la seguridad del consumidor. Por todo ello, los trabajos que se presentan en este capítulo, están enfocados en la evaluación de la capacidad antioxidante de SeNPs incorporados a adhesivos y, al estudio de la migración en envases multilaminares mediante el empleo alimentos como la avellana molida. Los trabajos que se recogen en este capítulo fueron realizados dentro del proyecto INNPACTO **(IPT-2012-0261-420000 Desarrollo de nuevos materiales antioxidantes con nanopartículas de selenio para envase flexible (NANOFLEXIPACK))** integrado por las empresas SAMTACK S.L. y MAGAPOR S.L. y, la Universidad de Zaragoza a través del grupo GUIAR del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza (UNIZAR).

El primer trabajo presentado dentro de este capítulo **(“New antioxidant packaging with nano selenium as active material multilaminar”** Analytica Chica Acta (*Enviado*)) es el resultado de una estrecha colaboración con el grupo de la Universidad de Zaragoza a través del proyecto mencionado anteriormente. En dicho trabajo, se ha evaluado la capacidad antioxidante de SeNPs sintetizadas con distintos agentes estabilizantes (chitosan, hidroxietil celulosa y surfynol) e incorporadas a diferentes materiales multicapas constituidos por (PET- adhesivo+SeNPs -PE). Para la determinación de la capacidad antioxidante, se empleó tanto el método DPPH como el método de radicales libres. La capacidad antioxidante se midió tanto en las

suspensiones de SeNPs, como tras su incorporación en el adhesivo y en los envases resultantes con diversos espesores de polietileno (35, 60 and 90 μm). Los resultados obtenidos indicaron que el método DPPH no resulta adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante de suspensiones de NPs debido a la dispersión del haz de luz por parte de las NPs. Tampoco resultó adecuado en su aplicación en los laminados, debido a la dificultad de la molécula de DPPH de difundirse a través de las capas y alcanzar el adhesivo donde se encuentran las SeNPs. Las medidas mediante el método de radicales libres evidenciaron la capacidad antioxidante de los laminados que incorporan SeNPs en el adhesivo. El espesor de la lámina de PE influyó en la capacidad antioxidante puesto que los radicales libres tienen más facilidad para cruzar la capa de PE cuanto menor es el espesor del laminado y, llegan con más facilidad al adhesivo, el cual contiene SeNPs donde los radicales son eficientemente neutralizados. Los mejores resultados en relación a la capacidad antioxidante se obtuvo cuando las SeNPs fueron preparadas empleando como estabilizante el tensioactivo no iónico etoxilado 2,4,7,9-tetrametil-5-decino-4,7-diol

Una vez demostrada la capacidad antioxidante de las SeNPs en el envase multilaminar, el siguiente factor a **evaluar** es **la posible migración de NPs desde el envase hacia el contenido**. Los estudios de migración se realizaron en alimentos (avellana molida) expuestas durante 10d a 40 °C. El contenido total de selenio presente en el alimento se llevó a cabo mediante ICPMS. Con el fin de diferenciar entre el selenio endógeno (existente en la avellana) con el exógeno (aportado por la migración de selenio desde el envase), se realizó la síntesis de SeNPs a partir del isótopo enriquecido ^{77}Se . Estas NPs isotópicamente marcadas se mezclaron con el adhesivo y, se fabricaron envases laminares con presencia de $^{77}\text{SeNPs}$ como material activo. El contenido de selenio en el alimento se determinó mediante ICPMS, previa mineralización ácida de la muestra, monitorizando el isótopo ^{77}Se . Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la baja tendencia de las SeNPs a migrar desde el envase al alimento, lo que asegura la seguridad del consumidor.

III.1. Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Diferentes Materiales con Nanopartículas de Selenio como Material Activo

“New antioxidant packaging with nano selenium as active material
multilaminar”

Analytica Chimica Acta (*Enviado*)

New antioxidant packaging with nano Selenium as active material in a multilayer

Abstract

The antioxidant properties of a flexible plastic multilayer material, to be used as a food container, when Selenium nanoparticles (SeNPs) are incorporated in the adhesive have been evaluated. For this purpose, both the diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and free radical assay have been used to study the antioxidant capacity of selenium nanoparticles (SeNPs) previously synthesized. The antioxidant capacity has been measured in a) the original solutions of SeNPs; b) after incorporation of SeNPs in the adhesive and c) in the final multilayer plastic material (formed by polyethylenterephthalate (PET) -adhesive-low density polyethylene (PE) to be used as food packaging, where the influence of PE thickness was also evaluated. The results showed that DPPH method is not valid for measuring the antioxidant properties of the multilayer material when the antioxidant is not placed in direct contact with the DPPH radical. In contrast encouraging results were obtained when using a free radical assay and antioxidant capacities for some of the nanoparticles around 70% were found. These results evidenced that SeNPs acted as very good antioxidant agents specially when using 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate as stabilizer. The final active multilayer demonstrated to be an efficient free radical scavenger, able to protect the packaged product versus oxidation. To the best of the authors' knowledge SeNPs are first evaluated as active material for preparing antioxidant food packaging where NPs are not in direct contact with food and therefore to extend the shelf life of food over time.

Keywords: antioxidant, free radical scavenger, nanoparticles, selenium, multilayer, adhesive, active packaging.

1. Introduction

The profound changes in production, distribution and storage of foods as well as the increased society demand that requires good quality products and longer shelf life, leads to the need of new ideas for the packaging sector. Some of these needs have been

satisfied with the use of active packaging, either antioxidant or antimicrobial packaging materials. They are classified in two big groups; scavenging systems or releasing systems. The first one is able to remove oxygen, water, ethylene, free radicals, etc. from the package, thus reducing the oxidation processes or early maturation of the packaged food. The other option releases mainly antimicrobial agents, which are capable to inhibit the microbial growth extending its useful life ^{1,2}.

Antioxidants can be classified in two categories depending on their nature: natural antioxidants, which are found in vegetables, fruits, herbs, essential oils, etc. that are rich in phenolic compounds ^{3,4}, and synthetic antioxidants with phenolic structure such as for example butylhydroxitoluene (BHT) ⁵. Evaluation of antioxidant capacity of a packaging material is not an easy task. It allows us to compare the antioxidant activity of different compounds and then select the most efficient ones for a specific application. This may be accomplished by various methods described in literature, which are based on two basic types of reaction mechanism ^{6,7}: the transfer of hydrogen atoms (HAT) as oxygen radical absorbance capacity (ORAC) ^{8,9} or total radical trapping antioxidant parameter trapping (TRAP), and electron transfer as TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) or DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl). All these assays require an extraction of the sample for its analysis as the reaction takes place in solution.

In 2006 Pezo et al.^{10,11} developed a novel analytical procedure that involved the measurement of antioxidant capacity directly in the packaging material without extracting the sample. In this method, an atmosphere enriched in free radicals carried by an inert gas passes through the active materials and bubbles into a salicylic acid solution. Here, a reaction between the radicals not trapped by the active material and this solution takes place, producing 2,3-dihydroxybenzoic (2,3-DHB) and 2,5-dihydroxybenzoic (2,5-DHB) acids, among other compounds. The major resulting compound, 2,5-DHB, analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a fluorescence detector, is correlated with the scavenging properties in such a way that the absence of 2,5-DHB in the solution means that radicals were well trapped by the material. This procedure has been automatized and now allowed to simultaneously analyze eight samples, where at least one of them had to be a blank without active compounds (used as a reference). The 2,5-DHB fluorescence signal obtained for each sample was then compared to the reference blank signal. A lower signal of this compound entailed a higher antioxidant capacity of the studied material,

because it meant that it was able to trap the free radicals and, therefore, reduce the concentration of 2,5-DHB in the solution.

Recent research has highlighted the potential for nanotechnologies use in a wide range of food applications, including supplements for improvement, novel food packaging, increasing the range of food textures, colours and tastes, increasing the efficiency of liquid filters, cooking oil catalysation and targeted crop pesticides. Among that, the use of nanoparticles to improve the properties of food packaging materials is one of the most active areas of interest. Selenium nanoparticles (SeNPs) can be considered as synthetic antioxidants. Several studies mention their antioxidant capacity, as well as their anticarcinogenic effect ¹². SeNPs are able to trap free radicals increasing their antioxidant effect with decreasing particle size ¹³. Based on that, the antioxidant capacity of SeNPs previously synthesized was evaluated. For this purpose, two methods were selected to evaluate the antioxidant capacity of both the SeNPs solutions and the laminates (multilayers where SeNPs were incorporated): DPPH and free radicals assay, which will allow making the measurements in the laminate materials. The paper demonstrates the antioxidant performance of the new active multilayer packaging material, discuss the mode of action of the antioxidant material as free radicals scavenger and opens new doors to further developments in the use of NPs.

2. Materials and methods.

2.1. Reagents

Sodium salicylate (CAS 54-21-2), 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) (CAS 490-79-9), hydrogen peroxide solution (34.01 mg/L), acetic acid (CAS 64-19-7), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (CAS 1898-66-4) and sodium acetate trihydrate (CAS 6131-90-4) were purchased from Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, Spain), all of them had analytical quality.

Methanol (high performance liquid chromatography, HPLC grade) was purchased from Scharlau Chemie S.A (Sentmenat, Spain). Purified water was obtained from a Milli-Q 185 Plus system from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Solutions of Se NPs, adhesive and laminates

SeNPs were synthesized using a solution-phase approach based on the reduction of selenite with ascorbic acid in the presence of different stabilizers agents polysaccharide (chitosan, a Poly(D-glucosamine)) or an ethoxylated non-ionic surfactant (Triton X-100 (t-octylphenoxypolyethoxy-ethanol)), isotridecanol ethoxylate and/or 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate. Characterization of the obtained SeNPs by Transmission Electron microscopy showed that the type of agent used for stabilizing SeNPs has a great influence on the size and morphology of the resulting NPs. SeNPs obtained using Chitosan, Hydroxyethylcellulose (HEC), Triton X100, and 2,4,7,9-tetramethyl 5decyne-4,7-diol ethoxylate were spherical with a diameter size within the range of (20-40), (≈ 100), (18-40) and (28-60) nm, respectively. The use of isotridecanol ethoxylate as stabilizer agent produced NPs with nanorods morphology.

Several solutions containing SeNPs were prepared with a composition detailed in table 1. . The antioxidant capacity of SeNPs solutions was determined by free radical assay and compared with the same solutions but without NPs (blank solutions). These solutions were added to a water-based polyurethane adhesive to manufacture laminates [substrate1-adhesive-substrate2]. Laminates were manufactured in the laboratory. First, the polyurethane adhesive was mixed either with 10% solution of SeNPs selected or with its respective blank solution (without SeNPs). Then, it was applied and extended on a 20 x 30 cm substrate (PET of 12 μm thickness) forming a uniform layer using an extender machine (K control coater, RK print). The gramage of adhesive applied was 3 g/m^2 on the laminate, which was weight controlled. Afterwards, a second 20 x 30 cm substrate (polyethylene of 35, 60 or 90 μm thickness) was placed on top of it and the laminate was pressed at 80°C and speed number 4 in a BiO 330 Laminator (Korea) forming the laminates shown in table 2.

Finally, two laminates with the same composition were thermosealed with a SUPER CELLO (Audion Elektro, Holland) forming a bag of dimensions 1.5 x1.5 dm^2 with inlet and outlet, through which the carrier gas enriched with free radicals flow passed. These bags were used to study the influence of the material thickness on the antioxidant capacity and also for the aging study. For the study of the antioxidant capacity with DPPH, bags of dimensions 1 x 0.5 dm^2 were prepared in the same manner.

2.3. Methods

2.3.1. Free radicals assay

In this method (Pezo et al 2006, 2008) an atmosphere enriched in free radicals was generated by ultraviolet radiation (254 nm) over a hydrogen peroxide water solution (0.29 mol/l) nebulized as an aerosol in a quartz tube and carried with inert gas current (N₂). This continuous flow was divided and passed through eight plastic bag samples (with or without active compounds) during 48 hours each, arriving at eight parallel salicylic acid solutions (2 µg/g), each one corresponding to an evaluated sample. The salicylic acid reacted with the radicals not trapped by the active materials, producing 2,3-dihydroxybenzoic (2,3-DHB) and 2,5-dihydroxybenzoic (2,5-DHB) acids, and catechol, being the major compound 2,5-DHB.

Then, the antioxidant capacity was indirectly evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to fluorescence detector where the 2,5-DHB produced, as the major reaction product, was determined in the different solutions. The equipment used was a Waters Separation module (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a 474 fluorescence detector (Waters, Milford, MA, USA). The chromatographic separation was carried out with a reversed column phase C18 (100 mm long, 4.6 mm i.d and 3 µm particle size) from Waters. The isocratic mobile phase was a mixture of methanol with aqueous acetate buffer (3.5 mmol/L, pH 5.8) with a 10:90 (v:v) at a flow rate of 1 ml/min. The volume injected was 20 µL. Wavelengths of 324 and 448 nm for emission and excitation respectively.

2.3.2. DPPH method

DPPH method was developed by Blois ¹⁴ to determine the antioxidant activity using a stable free radical (α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl). The assay consists of measuring the scavenging capacity of antioxidants towards this compound. The antioxidants donate a hydrogen atom and thus, the odd electron of nitrogen atom in DPPH is reduced to the corresponding hydrazine ¹⁵. This molecule is considered as a stable free radical because it delocalizes the spare electron over the molecule as a whole and does not dimerize, as happens with the majority of free radicals. This compound in methanol solution is deep violet colour and becomes colourless when mixed with a hydrogen atom donor substance. This process can be followed by a decrease in absorbance at 515 nm using an UV-Vis spectrometer (UV-1700 PharmaSpec, Shimadzu).

2.4. Determination of antioxidant capacity for the SeNPs solutions and adhesives.

To study the antioxidant capacity in the solutions of SeNPs by free radical assay, pipettes were filled with glass-wool and with 0.4 grams of each Se NPs solutions. Eight samples were simultaneously analyzed for each assay. Two of them contained only glass-wool (reference), three were filled with solutions without SeNPs (blank) and other three replicates with solutions containing SeNPs. The assay was carried out in the conditions above described. After 48 hours, 2,5-DHB was determined and the antioxidant capacity was expressed as hydroxylation percentage. This was calculated by the following formula: $(2,5\text{-DHB area}_{\text{sample}}/2,5\text{-DHB area}_{\text{reference}})*100$. Therefore, a lower percentage of hydroxylation entailed a higher antioxidant capacity.

The procedure for determining the free radical-scavenging activity of the solutions and adhesives by the DPPH method was as follows: A 100 mg/L solution of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) in methanol was prepared. Either 15 μl of the solution or 0.1 g of the adhesive containing 10% of the SeNPs (or blank) solution was placed in a 20 ml glass vial. The adhesive was dried on a hot plate for further evaluation. After cooling down, 10 ml of the DPPH solution were added. The vials were kept in the dark to avoid light interaction. A DPPH solution without SeNPs was used as a control. All samples and measurements were made in triplicate after 2 or 4 hours of reaction time depending on the antioxidant performance. The percentage of DPPH inhibition was calculated using the following equation: $(\text{DPPH_concentration}_{\text{control}} - \text{DPPH_concentration}_{\text{sample}})*100/\text{DPPH concentration}_{\text{control}}$.

2.5. Determination of antioxidant capacity of the laminates.

The type of SeNPs selected and its respective blank were incorporated into the adhesive to manufacture the multilayer plastic bags above mentioned. For each assay, eight bags with the same thickness of PE, corresponding to 35 μm , were prepared and analyzed simultaneously. Two out of them were prepared with blank adhesive, lam 0 (reference), three bags were built with adhesive containing 10% of solution without SeNPs (lam 1) and three with adhesive containing 10% of solution of SeNPs (lam 2). This assay was repeated for the different thicknesses of PE (60 and 90 μm) in order to study its influence on the radical scavenging capacity.

Then, several bags of $1 \times 0.5 \text{ dm}^2$, containing SeNPs and the control, were filled with 15 ml of the DPPH solution. The bags were placed in 125 mL amber vials to avoid light effect. The percentage of DPPH inhibition was calculated as in section 2.4.

2.5. Aging study of SeNPs in the adhesive.

An aging test to evaluate the efficiency of the SeNPs over time was performed. Several mixtures of the adhesive with 10% of the different SeNPs solution and their respective blanks were stored in vials at room temperature, 23°C. Approximately every fifteen days, with two of these vials (blank and SeNPs) the laminates with 60 μm PE (lam 0, lam 3 and lam 4) were prepared and the bags manufactured to perform the free radical assay again. Then, the antioxidant capacity was evaluated and monitored with time.

3. Results and Discussion

The principle of antioxidant behavior in this work is based on free radicals scavenging, following the theory described in C.Nerín 2010. This way, SeNPs incorporated in the adhesive are non-migrating free radicals scavengers and consequently act as good antioxidants, as will be demonstrated. The antioxidant capacity either for solutions and adhesives containing SeNPs with different stabilizing agents has been tested by the DPPH and free radical assay. The solution providing the maximum antioxidant capacity was incorporated into the adhesive for further laminates preparation of different thicknesses. Diffusion through the PE layer of oxo, hydroxo and peroxo radicals is efficiently achieved and then these free radicals arrive at the adhesive behind the PE layer and are scavenged. The stability of the SeNPs over time was examined as well. Both studies were carried out by free radical assay and DPPH method and the results are shown below.

3.1. Determination of antioxidant capacity for the SeNPs solutions and adhesives.

3.1.1. Free radical assay

Four solutions (1 to 4) containing 100 mg.L^{-1} Se NPs synthesized in presence of different stabilizing agents were used to evaluate the scavenger capacity by the DPPH and free radical assay and the results compared with those of the respective control.

The results obtained by the free radical assay are shown in Figure 1, where the antioxidant capacity is expressed as % hydroxylation. The glass-wood sample was used as blank reference (100% hydroxylation when there is not antioxidant capacity), and the rest were the solutions with or without SeNPs. A decrease of hydroxylation % is correlated to an increase of the antioxidant capacity.

Those solutions without containing SeNPs demonstrated to have certain antioxidant capacity, which can be attributed to the capacity to scavenge free radicals of the reagents used in the synthesis.

Only solution 4, among the four solutions containing 100 mg.L⁻¹ SeNPs, showed significant differences compared to the respective blank. Its hydroxylation percentage was lower than the control (53 % vs 70 %), so its antioxidant capacity was higher. This result demonstrates that the 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate, reagent used to stabilize the SeNPs solution, was the most appropriate for the antioxidant purpose.

Taking into account this positive result, higher concentration of SeNPs, 750 and 1000 mg.L⁻¹ (solutions 5 and 6), were tested (figure 1). The fact that an increase of SeNPs did not provide, as expected, an enhance of its antioxidant capacity was attributed to the limited concentration of 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate, as it was the same as that used for 100 mg.L⁻¹ Se NPs, which was not enough to stabilize all SeNPs.

Thus, the percentage of 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate in the solution of 1000 mg.L⁻¹ was increased to 1% (solution 7 and 8) and 7 % (solution 9 and 10) at two different pHs. The results obtained, also shown in figure 1, evidenced that the solutions with a higher percentage (7%) of stabilizing agent (solution 9 and 10) provided very encouraging results, as the hydroxylation percentage decreased to 14 and 19% for 1 and 7% respectively. These results evidenced that SeNPs acted as very good antioxidant agents, especially when using 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate as stabilizer.

3.1.2. DPPH Method

The antioxidant capacity of all the above mentioned solutions and adhesive containing SeNPs was tested (alone and once incorporated in the adhesive) by the DPPH method. However, the results obtained were not coherent with those previously obtained by the

free radical assay. Generally, for both the solutions and the adhesives, the DPPH inhibition of the blank was higher than that of the solution or adhesive with SeNPs. Also, the higher the concentration of SeNPs, the lower was the percentage of DPPH inhibition, and so, the antioxidant capacity. The results obtained for solutions with different concentrations of SeNPs prepared from solution 9 and its respective blank are shown in Figure 2. In addition to the mentioned lower antioxidant capacity for more concentrated solutions, the standard deviation of the three replicates was high. Similar results were obtained for solutions with different concentrations prepared from solutions 7, 8 and 10.

One possible explanation is that the nanoparticles interfere with the light measurement in the spectrophotometer. If a nanoparticle is found in the path of the light, a light scattering effect will take place and the absorbance at 515 nm will be higher. If this happens, it will seem as if the concentration of DPPH is higher than it really is, thus creating an optical interference.

Two strategies were applied to avoid this problem: centrifugation (4000 rpm for 45 min) and ultrafiltration of the solutions (Millipore centrifugal filter units, Amicon® Ultra-15. Ultracell 10K, 3500 rpm, 30min) both after the reaction time.

Not successful results were obtained by centrifugation but after ultrafiltration, and removal of the SeNPs from the solution, the results obtained were coherent with those obtained by the free radical assay (Figure 3), and the antioxidant capacity of the adhesives increased with an increment in SeNPs concentration. Also, the lower standard deviation between the three replicates, confirms the previous hypothesis. These results indicate that the DPPH method is not suitable for the analysis of antioxidant capacity of solutions containing nanomaterials in a single step, while the presence of nanoparticles does not interfere with the free radical assay.

A concentration of 100 mg.L^{-1} SeNPs in the adhesive was selected as the optimum. In addition, previous studies of compatibility with the adhesive established 10% as the maximum amount of solution that can be added to the adhesive without losing any adhesion capacity. The antioxidant capacity of the adhesives prepared with the different solutions in which 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate is used as stabilizing agent, after ultrafiltration, are shown in Figure 4. In all cases, adhesives prepared with blank solutions presented some antioxidant capacity. No significant differences in

antioxidant capacity were found between the solutions prepared with different concentrations of the stabilizing agent or at different pHs. The antioxidant capacity was slightly higher for the adhesive prepared with solution 7. However, according to the results obtained by the free radical assay, solution 9 was selected as the optimum to continue with the rest of the study and manufacture the laminates.

3.2. Determination of antioxidant capacity of the laminates and influence of PE thickness.

Once the solution with the higher antioxidant capacity (solution 9) was selected, an antioxidant adhesive with 10% solution (solution 9 or its respective blank) in a water-base polyurethane (PU) was prepared. Laminates with different PE thicknesses (35, 60 and 90 μ m) were tested, as described in section 2.2, and their antioxidant capacity evaluated by free radical assay and DPPH method.

The antioxidant capacity of laminates with different thicknesses was studied by the free radical method. Figure 5 shows the antioxidant capacity expressed as % hydroxylation (lam 0 as reference=100%), together with the different laminates, with and without SeNPs. As can be seen, the blank laminates (without SeNPs) possess a certain antioxidant capacity because the percentages of hydroxylation of lam 1, 3 and 5 were lower than those of laminate 0 (used as reference). This result is in good agreement with that obtained for the blank solutions without SeNPs, (section 3.1.1), and are due to some antioxidant compounds different than SeNPs in the composition.

On the other hand, laminates containing SeNPs (lam 2, 4 and 6) showed a lower % hydroxylation than their respective blanks (lam 1, 3 and 5). These results confirmed that SeNPs act as good free radical scavengers (antioxidant) by themselves. Furthermore, the hydroxylation percentage decreases when the thickness of PE layer decreases, (lam 2 < lam 4 < lam 6). This demonstrates that the free radicals from oxygen are able to cross the plastic layer (PE) and diffuse through it, then arriving at the adhesive where SeNPs were inserted. This effect can be explained by the facility of free radicals to reach the adhesive, and so to be scavenged when thin PE layers are used.

The percentage of DPPH inhibition obtained (not shown) was very similar for all the laminates studied and no significant differences with the adhesive with and without

SeNPs or with a bag of 60 μm PE were observed.. The large size of DPPH could prevent its diffusion through the PE layer and so its penetration to the layer of adhesive behind, where the SeNPs were placed. The lack of direct interaction between SeNPs-DPPH justifies that no scavenging effect takes place. Thus, it can be confirmed that the DPPH method is not suitable for measuring the antioxidant capacity in multilayer materials where the radical scavenger is not in direct contact with the reagent. It is important to point out that this is the first time that DPPH method has been applied to a radical scavenger placed behind a plastic layer.

3.3. Aging study of SeNPs in the adhesive.

Once the antioxidant capacities of the SeNPs applied to the laminates were confirmed, the stability of the adhesives over time was evaluated. This is a critical and important feature for further industrial use, due to the elapsed time from their production to their final end-user application to prepare the new antioxidant manufactured food packaging materials (normally in another industry).

Samples prepared with the new antioxidant adhesive with SeNPs or blank solutions were stored and analyzed at approximately fifteen days intervals. It was observed that SeNPs precipitated with time at the bottom of the vial being most of them within thirty days already deposited at the bottom, as Figure 6 shows. Therefore, the vial was sonicated for approximately 30 minutes to obtain a homogenous adhesive sample before application. Laminates of 60 μm PE thickness were then manufactured and analyzed by free radical assay.

Figure 7 shows the results of antioxidant capacity obtained at the different storage times. As can be observed, the percentages of hydroxylation for lam 4 increased from 40% to 90% over time, which evidences a considerable decrease in antioxidant performance. These results showed a close relationship between the decrease in antioxidant capacity of SeNPs laminates and the precipitation of nanoparticles. After 62 days, the percentage of hydroxylation found for lam 4 was 90%, similar to that obtained with the blank, so the SeNPs were not anymore in the adhesive and thus the antioxidant capacity was completely lost. This may be due to an aggregation of the SeNPs with time, not even able to separate into individual nanoparticles after sonication. This result

can be very useful for the suppliers of these materials as it is advised not to keep the mixture (adhesive-SeNPs) stored longer than one month.

4. Conclusions

The antioxidant capacity of SeNPs stabilized by different compounds was studied by both the DPPH method and the free radical assay. It has been demonstrated that among the stabilizing agents tested 7% of 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate at pH 3 is the most appropriate to be added to the adhesive and to the final multilayer material with different PE thickness. An increase in nanoparticles concentration also produced an increase in the antioxidant capacity of both the solutions and the adhesives, and so, 100mg.L⁻¹ was selected as the optimal concentration in the adhesive. Higher concentration caused a reduction of the adhesion properties.

It was demonstrated that DPPH is not the most appropriate method when the antioxidant, SeNPs in this case, is behind a polymeric layer, as the DPPH radical is not able to cross the plastic layer of PE and react with the antioxidant, when the antioxidant acts as scavenger and it is a non-migrating substance.

The thicker the laminate the lower the antioxidant capacity of the material because free radicals are able to cross more easily thinner laminates of the PE layer and efficiently scavenged when reaching the adhesive containing SeNPs

The adhesives with SeNPs are stable for a month, after which and even using sonication the antioxidant capacity is not recovered, probably due to an irreversible aggregation of the nanoparticles.

Bibliography

- (1) Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; van Beest, M.; de Kruijf, N.; Debevere, J. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*, 77.
- (2) Ozdemir, M.; Floros, J. D. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 185.
- (3) Brewer, M. S. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 221.
- (4) Colon, M.; Nerin, C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 9842.
- (5) Huang, M. T.; Ferraro, T. *Acs Symposium Series* **1992**, *507*, 8.
- (6) Huang, D. J.; Ou, B. X.; Prior, R. L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1841.
- (7) Prior, R. L.; Wu, X. L.; Schaich, K. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4290.

- (8) Bentayeb, K.; Vera, P.; Rubio, C.; Nerin, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 903.
- (9) Bentayeb, K.; Vera, P.; Rubio, C.; Nerin, C. *Food Chem.* **2014**, *148*, 204.
- (10) Pezo, D.; Salafranca, J.; Nerin, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 1241.
- (11) Pezo, D.; Salafranca, J.; Nerin, C. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1178*, 126.
- (12) Torres, S. K.; Campos, V. L.; Leon, C. G.; Rodriguez-Llamazares, S. M.; Rojas, S. M.; Gonzalez, M.; Smith, C.; Mondaca, M. A. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*.
- (13) Huang, B.; Zhang, J. S.; Hou, J. W.; Chen, C. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 805.
- (14) Blois, M. S. *Nature* **1958**, *181*, 1199.
- (15) Contrerasguzman, E. S.; Strong, F. C. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1982**, *65*, 1215.

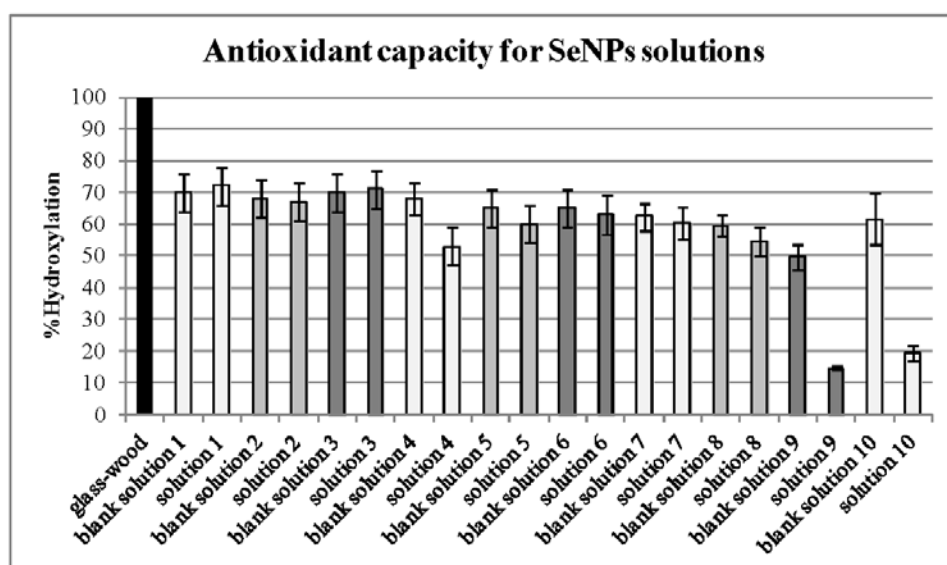


Figure 1: Antioxidant capacity expressed as % hydroxylation for the solution with or without Se NPs synthesized with different stabilizing agents and with different conditions.

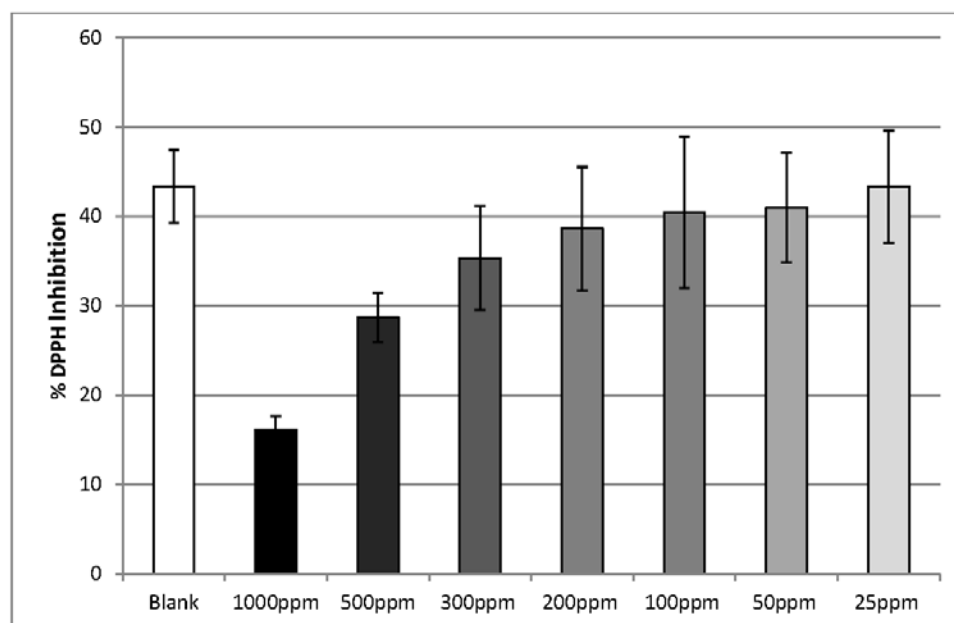


Figure 2: % DPPH inhibition obtained for solutions with different concentrations of SeNPs prepared from solution 9 and its respective blank.

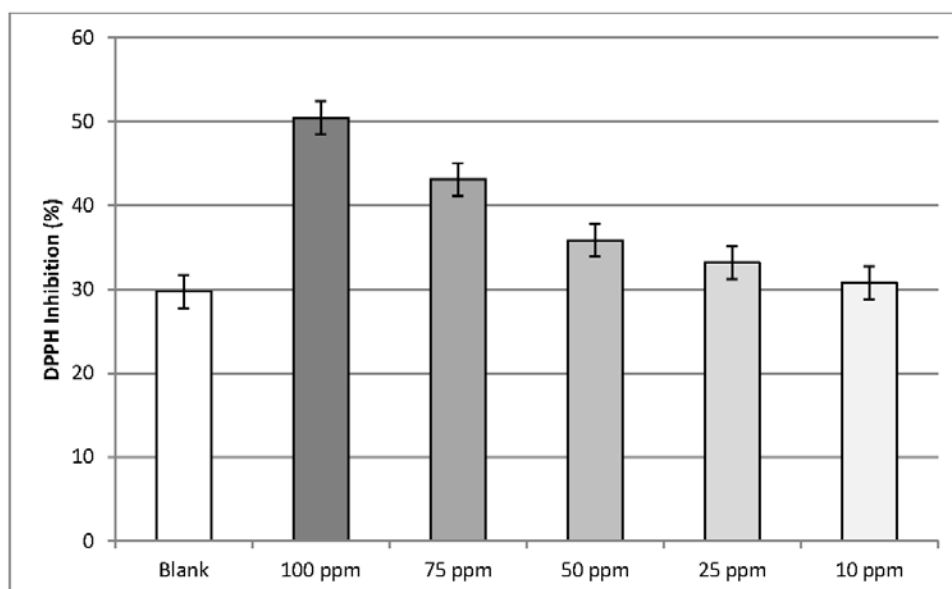


Figure 3: Results of DPPH inhibition obtained for adhesives with different concentrations of SeNPs prepared from solution 9 after ultrafiltration.

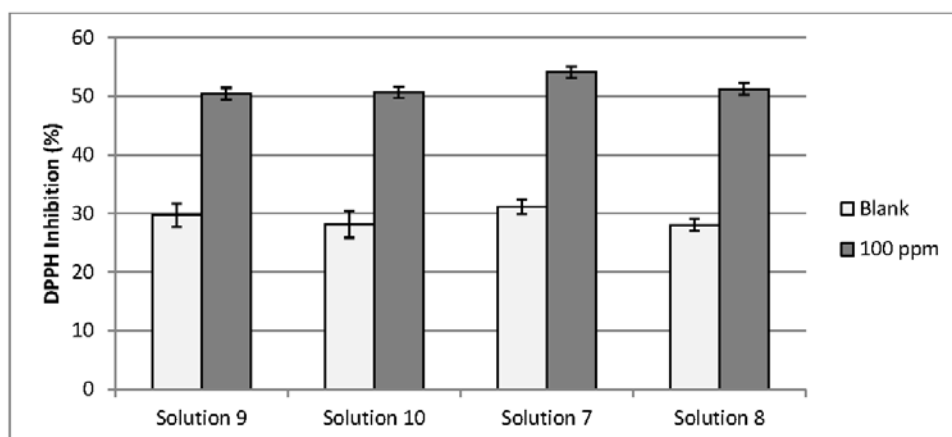


Figure 4: Antioxidant capacity (expressed as % DPPH inhibition) for the adhesives prepared with the solutions with 2,4,7,9-tetramethyl-5decyne-4,7-diol ethoxylate as stabilizing agent, after ultrafiltration.

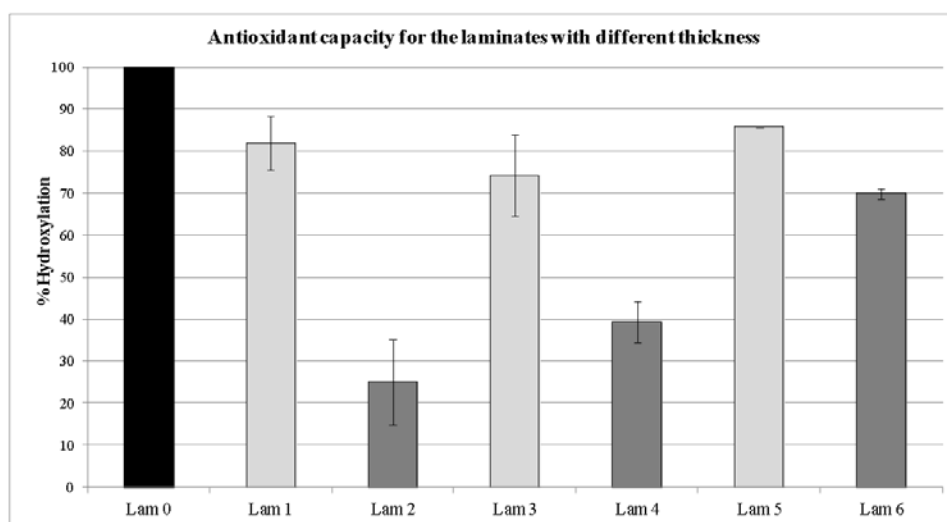


Figure 5: Antioxidant capacity expressed as % hydroxylation for the laminates with or without Se NPs for different thickness.



Figure 6: SeNPs deposited at the bottom of the vial after 30 days.

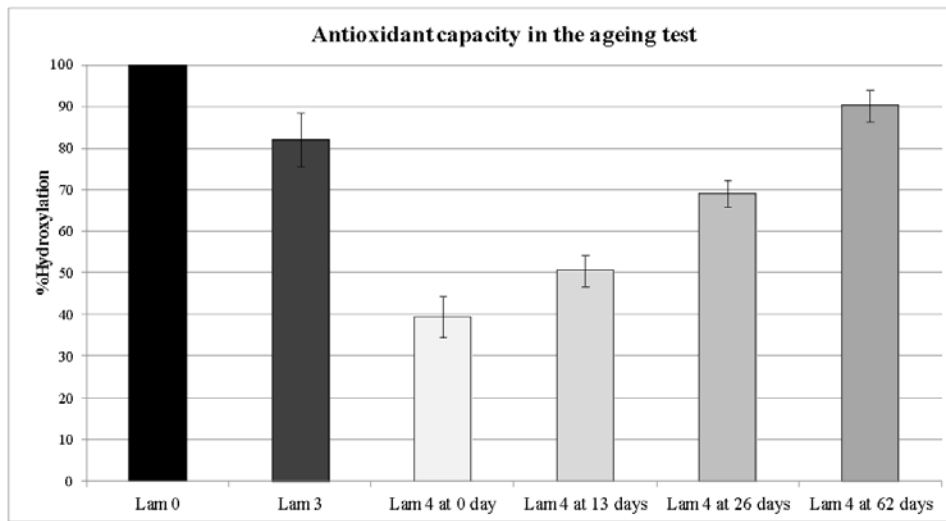


Figure 7: Antioxidant capacity expressed as % hydroxylation for the laminates with PE 60 μm in the ageing test

III.2 Evaluación de Migración de las SeNPs desde el envase al alimento.

La síntesis de $^{77}\text{SeNPs}$ se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que se aplicó a las otras SeNPs. El mecanismo se basa en la reacción entre el agente estabilizante etoxilado 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol (Sigma-Aldrich (EE.UU.)) mezclado con el agente reductor (ácido ascórbico (Sigma -Aldrich (EE.UU.))) y el selenio isotópico (^{77}Se) (Cambridge Isótopes Laboratories (Reino Unido) (después de ser disuelto como selenito en HCl 3%). La composición de la suspensión final de $^{77}\text{SeNPs}$ fue ácido ascórbico 0.054 M, 2,4,7,9 -tetrametil-5decin-4,7-diol etoxilado 6.5% y $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ^{77}Se a $\text{pH}\approx 3$. El tamaño y la morfología de las $^{77}\text{SeNPs}$ en disolución se estableció mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (TEM) (JEOL JEM 2100, EE.UU.) (Figura 10) y el análisis de la composición por espectroscopía de energía dispersiva de Rayos-X (XEDS) (Oxford Inca). Como se muestra en la figura 10, el tamaño y morfología de las $^{77}\text{SeNPs}$ obtenidas fue similar a las sintetizadas empleando selenito en su abundancia natural. Las nanopartículas presentaban una morfología esférica y en estado de no agregación y en rango de tamaño de partícula de 50-60 nm.

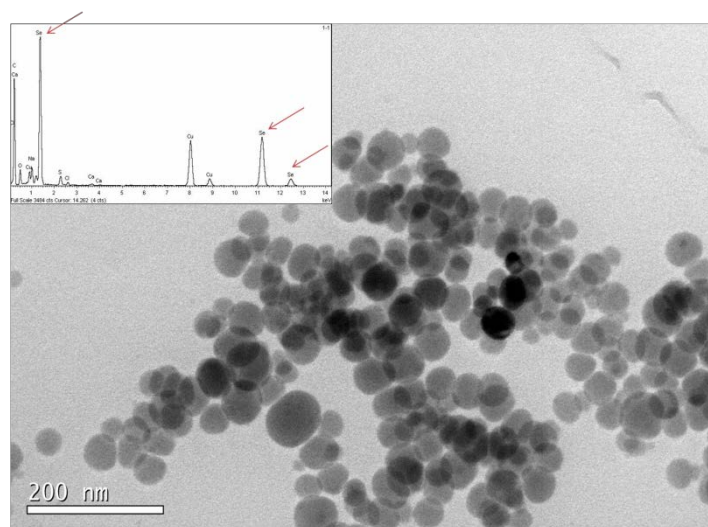


Figura 10. Imagen de TEM y espectro de XEDS para $^{77}\text{SeNPs}$. $T=20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, etoxilado 2,4,7,9 -etrametil-5decin-4,7-diol 6.5%, ácido ascórbico 0.054 M y $100\text{ }\mu\text{g }^{77}\text{Se}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las flechas rojas indican los picos de absorción correspondientes a las líneas SeL_{α} , SeK_{α} y SeK_{β} a 1.3, 11.2 y 12.4 keV, respectivamente.

Para la fabricación del envase laminado de estructura [PET-adhesivo-PE] con incorporación de $^{77}\text{SeNPs}$, la disolución de $^{77}\text{SeNPs}$ se mezcló con un adhesivo de poliuretano a base de agua (cuya fórmula se encuentra bajo protección de patente

PCT/ES2006/000311). En primer lugar, el adhesivo de poliuretano se mezcló con un 10% de la disolución $^{77}\text{SeNPs}$ ó con su respectivo blanco (sin NPs). Luego, se aplicó y extendió en un sustrato (PET de 12 μm de espesor) de 20 x 30 cm para formar una capa uniforme usando una máquina de extensor (revestidor de control K, impresión RK). El gramaje del adhesivo aplicado fue de 3 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ sobre el laminado. Posteriormente, un segundo sustrato (polietileno de 35, 60 o 90 μm de espesor) de 20 x 30 cm se colocó en la parte superior de la misma y el laminado se prensó a 80 °C. Por último, los laminados fueron termosellados (Audion Elektro, Holanda) para formar una bolsa de dimensiones 1,0 x 1,5 dm^2 . Estas bolsas llenas de avellana se utilizaron para estudiar la influencia del espesor del material en la migración de NPs. Para el estudio de la migración, las bolsas fueron expuestas durante 10d a 40 °C, de acuerdo con la legislación de la UE 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.

La posible migración de $^{77}\text{SeNPs}$ incorporadas en el envase se evaluó por ICPMS. Después del almacenamiento de los envases con diferente espesor de PE bajo condiciones mencionadas anteriormente, se tomaron y se digirieron las muestras de avellana (500 mg) con HNO_3 concentrado (Merck) y H_2O_2 30 % (Panreac) (5:1 v:v) usando un horno de microondas asistido con reactores de teflón bajo presión (CEM, Mattheus, NC). El extracto resultante se diluyó con agua desionizada y el Se se determinó por ICP-MS (Agilent HP7700x, EE.UU.) bajo las condiciones mostradas en la Tabla 8. Además, también se analizaron las muestras en envases sin $^{77}\text{SeNPs}$ como controles. Los resultados se expresaron como el valor medio (desviación estándar para $n=3$).

Tabla 8. Condiciones de operación del ICPMS

Parámetros ICPMS	
Potencia RF (W)	1550
Flujo de gas del plasma ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	15.0
Flujo de Ar auxiliar ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	0.30
Flujo de gas transportador ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	0.75
Nebulizador	Conikal

Cámara de spray	Scott
Modo de adquisición	Contínuo
Isótopos monitorizados	^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se
Réplicas	3
Gas de reacción	H_2
Flujo de gas de reacción ($\text{mL H}_2 \cdot \text{min}^{-1}$)	6

El contenido endógeno de selenio en las avellanas fue de $120 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Los resultados sobre la relación $^{77}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ en las avellanas después de la digestión ácida, fueron similares y no se encontraron diferencias significativas entre los controles (muestras contenidas en los envases sin SeNPs) ó envases con $^{77}\text{SeNPs}$ incorporadas. Por otra parte, no se observó efecto del espesor del material en la migración de $^{77}\text{SeNPs}$. Por lo tanto, las cantidades extraídas de selenio en el alimento, se encontraban por debajo de los límites máximos permitidos ($10 \mu\text{gSe} \cdot \text{Kg}^{-1}$). Esto demuestra la baja tendencia del selenio para migrar a los alimentos en las condiciones normalizadas del reglamento UE 10/2011 (almacenamiento durante 10 días a 40°C).

**Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.
Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes**

V. DISCUSIÓN INTEGRADORA

DISCUSIÓN INTEGRADORA

El trabajo de investigación desarrollado en esta memoria presenta como hilo conductor las SeNPs, y presenta una doble finalidad. Por un lado, la síntesis y caracterización (tamaño, morfología, composición y efecto del estabilizante) de las SeNPs y por otro lado, evaluar sus posibilidades de aplicación en la industria alimentaria. Las aplicaciones de las SeNPs se han centrado en dos campos. El primero de ellos, como fuente de selenio para el desarrollo de alimentos enriquecidos en este elemento (basados en procesos de fermentación láctica y biofortificación de cultivos). Para ello, se evaluó la toxicidad de estas nanopartículas frente a bacterias lácticas (*Lactobacillus Bulgaricus*) y plantas (rábanos, *Raphanus sativus*); así mismo, se comparó su comportamiento frente al ofrecido por el selenito sódico (forma habitual de suplementación de selenio). La segunda de las aplicaciones se centró en el desarrollo de envases multicapa flexibles con capacidad antioxidante, mediante la incorporación de las SeNPs en el adhesivo. Para abordar los objetivos planteados en este trabajo, fue necesario la aplicación de una gran variedad de técnicas que incluyen: microscopía de transmisión electrónica y AF⁴ acoplada a UV-VIS e ICPMS, para la caracterización y cuantificación de SeNPs. El estudio de los mecanismos citotóxicos involucrados en la interacción entre las NPs y las bacterias implicó la utilización de

técnicas como citometría de flujo y microscopía de transmisión electrónica. La acumulación de selenio y su biotransformación por parte de plantas y bacterias supuso el empleo de metodologías basadas en el ICPMS y HPLC-ICPMS, respectivamente. Y por último, mediante el empleo de varios ensayos (radicales libres y DDPH) se estudió la capacidad antioxidante de las SeNPs incorporadas a envases flexibles.

A continuación, se discuten globalmente los resultados obtenidos tras la realización de los diferentes trabajos encuadrados en la presente Tesis Doctoral.

En los últimos años, ha crecido el interés en la búsqueda de aplicaciones para las SeNPs, ya que han sido varios los autores que han puesto de manifiesto los prometedores efectos beneficiosos de estas NPs. Sin embargo, no cabe duda que sus posibles aplicaciones dependen de conocer los efectos de las mismas en su interacción con sistemas biológicos. Debido a esta necesidad, y por los motivos comentados anteriormente, parte de esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de las SeNPs, y en la evaluación de sus efectos biológicos en bacterias del género *Lactobacillus Bulgaricus* y en plantas (*Raphanus sativus*).

La primera etapa llevada a cabo en el desarrollo de este trabajo consistió en la optimización de un **método de síntesis de SeNPs**. La mayoría de los trabajos aparecidos en la bibliografía relacionados con NPs ponen de manifiesto la necesidad de emplear agentes estabilizantes en el medio de reacción con el fin de obtener dispersiones de NPs estables. En nuestro trabajo, la síntesis de SeNPs se llevó a cabo mediante un mecanismo de gelación iónica a partir de una reacción redox entre el ácido ascórbico (agente reductor) y el Na_2SeO_3 , **empleando distintos agentes estabilizantes. Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas mediante TEM y, complementariamente por AF⁴-UV-VIS-ICPMS.**

El mecanismo de gelación iónica empleado en la síntesis de NPs es un proceso bastante empleado debido a su simplicidad. En este procedimiento, tanto el agente estabilizante como el reductor se disuelven en medio ácido bajo agitación constante, y a continuación se añade el selenito sódico, formándose las SeNPs que quedan atrapadas en el agente estabilizante favoreciendo su dispersión.

En este trabajo se emplearon como agentes estabilizantes polímeros (chitosan e hidroxietilcelulosa) y tensioactivos no iónicos. La selección de los agentes estabilizantes no sólo se basó en su capacidad para modificar el tamaño, morfología, y estado de agregación de las NPs, sino también por su compatibilidad con los adhesivos aniónicos industriales a emplear en el desarrollo de envases alimentarios. Los agentes estabilizantes seleccionados poseen distinta naturaleza química y grupos funcionales, lo que va a influir no sólo en las características morfológicas de las NPs, sino también en sus propiedades físico-químicas y biológicas.

El Chitosan es uno de los polímeros más empleados en el campo de la biomedicina, biotecnología e industria alimentaria. Su presencia en el medio de síntesis originó SeNPs de geometría esférica en estado de no agregación y con un intervalo de tamaño de partícula de 20–40 nm, empleando las condiciones de síntesis evaluadas en este trabajo. Debido al valor de su punto isoeléctrico ($pI \approx 6.2$), su empleo en aplicaciones o estudios que requieran un pH superior a 6, presenta serias limitaciones. Cuando el pH es superior a 6, los grupos aminos presentes en la estructura del Chitosan se desprotonan y el polímero pierde su carga, volviéndose insoluble y formando agregados; además, las SeNPs pierden su geometría esférica debido a la pérdida del recubrimiento. Por ello, el chitosan fue descartado para la síntesis de SeNPs cuando éstas van a utilizarse en el desarrollo de envases alimentarios. Por todo ello, se evaluaron otras sustancias como agentes estabilizantes que fueran compatibles con los adhesivos empleados en la preparación del envase multicapa.

El segundo polímero empleado en la síntesis, se trata de la hidroxietilcelulosa (HEC) el cual es un derivado de la celulosa en el que sobre los grupos hidroxilo se han adicionado grupos de óxido de etileno. Se caracteriza por formar geles viscosos en agua muy útiles para fabricar productos dietéticos, cosméticos y detergentes. Contrariamente al Chitosan, presenta estabilidad en amplio rango de pH (2-11). La morfología de las NPs sintetizadas también fue esférica y no agregada para todos los porcentajes de HEC empleados (desde 0.1% a 0.5%). Sin embargo, la distribución de tamaños se vio afectada de manera notable. Empleando una concentración de HEC de 0.1% se consiguió la síntesis de NPs con un tamaño segregado en dos grupos de ≈ 5 y

≈100 nm. Para concentraciones superiores al 0.5%, se obtuvieron un tamaño homogéneo de NPs esféricas ≈100 nm.

Otros estabilizantes empleados fueron tensioactivos no iónicos. Estos compuestos poseen múltiples aplicaciones en diversos sectores: cosmético, farmacéutico, alimentario, productos de limpieza y síntesis de nanopartículas. Además, frente al uso de surfactantes iónicos ofrecen varias ventajas: forman suspensiones más estables, con menor espuma y presentan menor toxicidad. Otra ventaja adicional es que su uso es independiente del pH. Los estabilizantes seleccionados fueron tensioactivos no iónicos con diferentes estructuras y grupos funcionales: Tritón X-100 (*t*-octilfenoxipoliethoxietanol), Surfynol (etoxilado 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol) y Lumiten (Ettoxilado Isotridecanol). Estos tensioactivos originaron SeNPs esféricas no agregadas, salvo en el caso de las NPs sintetizadas con Lumiten como estabilizante. En este caso, las NPs presentaban morfología de nanohilos con una longitud variable, pudiendo llegar a las 2 μm y con un espesor por debajo de los 100 nm. Esto podría justificarse debido a la estructura lineal que presenta este estabilizante y al menor impedimento estérico. Los diámetros de partículas obtenidos para las SeNPs con *t*-octilfenoxipoliethoxietanol y etoxilado 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol como estabilizantes se encontraban en el rango de 18-40 y 28-60 nm, respectivamente.

Además del empleo de diversos agentes estabilizantes, es importante controlar otros factores claves durante la síntesis como pueden ser la concentración de agente reductor, estabilizante y pH de la suspensión. Pudimos comprobar como la morfología de las SeNPs esféricas no se alteraba y, en líneas generales existía una relación lineal entre concentración de agente estabilizante y tamaño de NPs; no así, sucedía con el agente reductor donde la tendencia no era tan evidente, aunque sí se apreciaba una disminución en el tamaño al aumentar la concentración de ácido ascórbico.

Un factor importante a tener en cuenta en la síntesis de NPs es la eficiencia de formación, es decir, el porcentaje real de Se incorporado como NPs tras el proceso de síntesis. La eficiencia de formación de SeNPs se determinó llevando a cabo un proceso de diálisis con membrana de corte de 3.5 kDa y posterior análisis mediante ICPMS. Se

observó como en todos los casos empleando una concentración de estabilizante superior al 0.1%, se conseguían eficiencias superiores al 90%.

El tamaño de las SeNPs obtenidas se evaluó mediante TEM y fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico acoplado al ICPMS (AF⁴-ICPMS). La aplicación de la metodología de AF⁴-ICPMS supuso la optimización de los siguientes parámetros experimentales como: el caudal del flujo perpendicular o “*cross flow*”, tiempo de inyección/focalización, composición de la fase móvil y tipo de membrana y, espesor de la misma (espaciador). La separación se llevo a cabo empleando una membrana de celulosa regenerada (RC, regenerated cellulose) de tamaño de poro de 10 kDa. El motivo de seleccionar este tipo de material reside en su carácter hidrofóbico. La membrana RC se considera menos hidrofóbica que otros materiales como polietersulfona (PES, polyethersulfone) o polifluoruro de vinilideno (PVDF, polyvinylidene difluoride), y por lo tanto favorece la recuperación de las NPs.

Respecto a la fase móvil es muy importante llevar a cabo una optimización de sus diferentes componentes como: fuerza iónica, presencia de agentes surfactantes y valor de pH. La influencia de todos estos parámetros está estrechamente relacionada con las interacciones producidas entre las NPs y la membrana, e incluso con las interacciones entre NPs. En muchos estudios se ha recomendado la adición de electrolitos. En concreto, el uso de cationes monovalentes como Na⁺ (NaNO₃, CH₃COONa) ó NH₄⁺ (NH₄NO₃, CH₃COONH₄), ya que evitan la agregación de muchos tipos de NPs en comparación con el empleo de cationes divalentes como Ca²⁺ (Ca(NO₃)₂). A la hora de seleccionar un valor de fuerza iónica es importante conocer el tipo de estabilización de las NPs. Las NPs estabilizadas electrostáticamente son más sensibles al efecto de la acción de ciertos iones, ya que éstos pueden modificar las fuerzas electrostáticas establecidas entre la NPs y su recubrimiento. En el caso de las SeNPs, al estar estabilizadas con polímeros, la fuerza iónica no constituía un parámetro tan crítico, por lo que en nuestro estudio se decidió prescindir de la adición de electrolitos. Paralelamente, y puesto que disponíamos de SeNPs estabilizadas con polímeros que podían sufrir problemas de floculación a pH básicos, se ajustó el pH a 5. El caudal del flujo perpendicular o “*cross flow*” es uno de los principales parámetros que influyen en la distribución de las NPs a lo largo de la membrana, y por

consiguiente en su separación. La optimización de este parámetro instrumental requiere especial atención, ya que dependiendo del tipo de NPs los criterios establecidos sobre si un determinado valor de “cross flow” es bajo o alto pueden variar. En nuestro caso, se probaron distintos valores de caudal ($1\text{-}4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) para un mismo espaciador, obteniéndose la mejor separación de las SeNPs para el caudal mas elevado; sin embargo y ante la elevada retención de las SeNPs en la membrana bajo estas condiciones, se optó por modificar y optimizar el espaciador. De hecho, se ha demostrado como el efecto de duplicar el espaciador (en nuestro caso, pasar de $250\text{ }\mu\text{m}$ a $500\text{ }\mu\text{m}$) tiene el mismo efecto que aumentar cuatro veces el “cross flow”, sin los efectos colaterales de retención de partículas. Por ello, los mejores resultados en la separación de las NPs fueron obtenidos empleando un “cross flow” de $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ empleando un espaciador de $500\text{ }\mu\text{m}$ los que la recuperación fue de $91 \pm 1\%$.

Uno de los inconvenientes de las separaciones con AF^4 es la interacción entre las NPs y la membrana. El grado de interacción se mide con la recuperación que se calcula mediante la integración de cada pico asignado en el fractograma después de que la muestra se haya inyectado en presencia (m) y en ausencia de “cross flow” (m_0):

$$R (\%) = (m/m_0) \times 100$$

El tiempo de inyección/focalización fue el último parámetro instrumental optimizado. Durante esta etapa, las NPs se focalizan en un zona estrecha de la membrana gracias a la influencia de un caudal denominado de focalización. El empleo de tiempos de inyección muy cortos puede dar lugar a picos de “volumen muerto” de mayor intensidad, mientras que tiempos largos provocan largos tiempos de elución. Los mejores resultados fueron obtenidos empleando un tiempo de inyección/focalización de 2 min .

Uno de los problemas más discutidos en los estudios relacionados con AF^4 es la falta de reproducibilidad y la baja recuperación de los análisis, debido en gran parte a la existencia de interacciones NPs-membrana. En estos casos, se requiere una estabilización previa de la membrana. Esta estabilización se puede lograr a través de varias inyecciones consecutivas de la dispersión de NPs hasta conseguir una saturación

de la membrana. De esta manera, se consigue modificar la carga superficial de la membrana y se mejora la recuperación.

La correcta determinación del tamaño de las NPs es clave a la hora de llevar a cabo su caracterización. Hasta la fecha, obtener la información correcta sobre la distribución de tamaños de las NPs constituye una cuestión muy relevante en los análisis mediante AF⁴. Se han propuesto diferentes estrategias para conseguir esta finalidad: la aplicación de las ecuaciones de la teoría de FFF ó el empleo de métodos de calibración con patrones de compuestos y/o NPs de tamaño conocido. Sin embargo, ambos métodos pueden dar lugar a informaciones erróneas ya que no tienen en cuenta posibles cambios en los tiempos de elución debido a las propiedades físicas o químicas de las NPs, o a las interacciones NPs-membrana. En nuestro estudio y ante la ausencia de SeNPs disponibles comercialmente con tamaño certificado, se optó por el empleo de NPs esféricas de poliestireno (PSL) comerciales de tamaño conocido. Se ha demostrado que para determinados tipos de NPs, como es el caso de las SeNPs el empleo de NPs de PLS de tamaño conocido es adecuado para su caracterización. Tras aplicar las condiciones optimizadas para la separación de SeNPs en los patrones de PSL, se obtuvo un ajuste lineal de los tamaños de NPs en función de los tiempos de retención.

La composición química es un parámetro que no se recoge en la ecuación FFF clásica y tiene una influencia significativa en el tiempo de retención. En estudios recientes, se han comparado los fractogramas de NPs de 100nm de Se, Au, Ag y PSL, observándose un aumento en el tiempo de retención con la densidad de núcleo de las NPs, además de un cambio en la forma de los picos. Sin embargo las nanopartículas de PSL y SeNPs aparecieron ambas al mismo tiempo de retención. En este caso la menor densidad del selenio con respecto a la composición de las otras NPs metálicas, hace que la composición química no sea un factor determinante en su separación, siendo el tamaño el principal factor que afecta a su tiempo de retención.

Tanto la técnica AF⁴-UV-VIs-ICPMS como el TEM proporcionaron tamaños de SeNPs similares, lo que sugiere que la primera es adecuada para la caracterización de las SeNPs, siempre y cuando las nanopartículas tengan una morfología esférica y no se

encuentren agregadas. Las SeNPs con distintos estabilizantes (y por tanto, con distintos tamaños) se evaluaron en relación a su futura aplicabilidad en la industria alimentaria como fuente de selenio para producir alimentos enriquecidos en selenio y en el desarrollo de envases alimentarios con capacidad antioxidante.

Los alimentos funcionales enriquecidos en Se constituyen una herramienta con un gran potencial para paliar las carencias y enfermedades asociadas a estados deficitarios de Se. El enriquecimiento de estos alimentos se puede realizar antes de su procesamiento mediante procesos de biofortificación de materias primas, como podría ser el caso de los vegetales, o bien durante su elaboración, resultando esta última una alternativa sencilla y rápida. Dentro de esta última estrategia y en la línea de investigación de la presente tesis doctoral, **se encuentra la preparación de alimentos fermentados enriquecidos en selenio mediante el concurso de las bacterias lácticas**. Para ello es necesario establecer el mecanismo de interacción SeNPs-bacterias.

Uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de desarrollar un ensayo *in vitro* es la estabilidad de las NPs en las condiciones fisiológicas empleadas. Las proteínas, electrolitos y otras sustancias presentes en el medio de cultivo tienden a interaccionar con las NPs lo que puede dar lugar a una modificación de su estado de agregación, o incluso alterar la interacción entre las NPs y las células, afectando a su citotoxicidad. En nuestro caso, no se observó agregación de las SeNPs tras su adición en los medios de cultivo MRS, por lo que se procedió a la segunda parte del trabajo que se ha centrado en el **estudio de las SeNPs y, en la evaluación de sus efectos biológicos sobre *Lactobacillus Bulgaricus***. Los resultados obtenidos se compararon con los proporcionados con el selenito que, es la forma habitual de suministrar selenio.

Los estudios de crecimiento bacteriano fueron los primeros ensayos llevados a cabo para evaluar los efectos biológicos de las SeNPs. Para ello, los *Lactobacillus* se cultivaron en medio de cultivo MRS suplementado con Se(IV) y SeNPs (sintetizadas con diferentes estabilizantes que presentaban distinto tamaño de partícula) a dos niveles de exposición (1 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Se) y durante 24, 48 y 72 horas. La monitorización del crecimiento bacteriano se realizó mediante medidas de densidad óptica a 600nm (OD_{600}). Las curvas de crecimiento obtenidas demostraron que a bajas

concentraciones de Se ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), las SeNPs no afectaban al crecimiento bacteriano con respecto a bacterias control (bacterias no suplementadas con selenio). Por el contrario, para exposiciones a elevadas concentraciones de selenio ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sí se observaron diferencias. Las SeNPs sintetizadas con quitosan e hidroxietil celulosa no afectaron significativamente el crecimiento bacteriano. En contraposición, aquellas SeNPs preparadas empleando un tensioactivo no iónico como el surfynol, inhibió el crecimiento bacteriano. Esta inhibición se produjo también cuando se añadía el tensioactivo al medio de cultivo, indicando que la toxicidad de SeNPs estabilizadas con tensioactivos no iónicos no es debida a su acción directa sino al propio estabilizante. Estos datos ponen de manifiesto la importancia del agente estabilizante en la toxicidad de las NPs. Una correcta evaluación de la misma requiere una evaluación de la toxicidad del estabilizante. Esta información muchas veces no aparece recogida en la mayoría de las publicaciones relacionadas con las NPs. Adicionalmente, los resultados de crecimiento bacteriano evidenciaron que las bacterias lácticas son más tolerantes a la presencia de selenio en forma de SeNPs (estabilizadas en quitosan e hidroxietilcelulosa) que a la presencia de selenito.

Los estudios de la viabilidad de las bacterias frente a la exposición a selenio (a 24 y 48 horas) y mediante medidas de citometría de flujo corroboraron los estudios anteriores. Los resultados de este ensayo demostraron nuevamente, que el tipo de estabilizante empleado en la estabilización de las SeNPs a concentraciones muy elevadas ($10 \mu\text{g Se}\cdot\text{mL}^{-1}$) influye significativamente en la viabilidad de las bacterias. Se corroboró, como el empleo de tensioactivos no iónicos disminuye la viabilidad en un 90% a las 24h de exposición; mientras que, el empleo de polímeros como estabilizantes, además de no inducir toxicidad en las bacterias, aumentan la viabilidad de las mismas con respecto a la exposición a Se(IV) en casi un 50% a las 48h. Estos estudios de viabilidad son de gran importancia para la aplicación futura de las SeNPs para preparar alimentos fermentados enriquecidos en selenio. El empleo de marcadores fluorescentes como Syto9/IP, permite discriminar en una población mixta de células aquellas que permanecen con la membrana celular íntegra, de aquellas que tienen la membrana deteriorada y están por lo tanto muertas (marcadas

exclusivamente con IP). La pérdida de la integridad de membrana, refleja la ausencia de capacidad de crecimiento o reproducción y actividad metabólica.

La apoptosis es una forma regulada genéticamente de muerte celular programada, esencial para el desarrollo y a largo plazo, viabilidad de los organismos multicelulares. La inducción de la apoptosis tiene lugar en respuesta a una variedad de estímulos intra/extracelulares y estrés. Este proceso controlado incluye la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, y la exposición de fosfatidilserina (PS) en la membrana externa. Estos cambios fisiológicos previenen de efectos dañinos a las células vecinas como ocurriría durante la muerte incontrolada ó necrosis, llevando al reconocimiento y fagocitosis de las células muertas por macrófagos. Hasta la fecha, los estudios relacionados con apoptosis en células procariotas han sido muy escasos, enfocándose la mayoría a la evaluación de la apoptosis o muerte celular programada en células eucariotas. En este estudio, mediante el uso conjunto de la citometría de flujo y el marcador fluorescente Annexina-V, un anticoagulante humano altamente específico a PS, hemos sido capaces de detectar la exposición extracelular de PS en *Lactobacillus Bulgaricus* expuestas a selenio. El porcentaje de células positivas a Annexina-V tras una exposición a $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Se en forma de Se(IV) y CS-SeNPs durante 24 y 48h fue del 7%. Se trata de un porcentaje muy modesto, pero diferenciable de las bacterias control. Estos valores tan bajos de PS son debidos a que en las membranas bacterianas los niveles de este fosfolípido son muy bajos, debido a su rápida conversión a fosfatidiletanolamina, mediada por la enzima PS decarboxilasa. Estos resultados coinciden con otros aparecidos en la bibliografía, así se ha detectado la traslocación de PS de una manera activa en *Escherichia Coli*, de manera similar a como sucede en el proceso de apoptosis, en contra de la exposición espontánea que tiene lugar mediante otras formas de muerte celular, entre los que se incluye la necrosis.

Es importante mencionar en este punto, que células bacterianas marcadas con Annexina-V no presentaban pérdida de la integridad de membrana (monitorizada por el marcaje mediante Syto9/IP), por lo que la exposición de PS no se encontraba originalmente en el exterior de la membrana, sino que es producto de un proceso de translocación del interior al exterior de la bacteria.

Uno de los factores más relevantes a la hora de determinar la citotoxicidad de las NPs, y entender los mecanismos biológicos implicados, es el grado de asimilación o internalización celular. En muchos estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que la cantidad de NPs que consiguen atravesar la membrana celular, y localizarse en el interior de las células es la que origina los efectos citotóxicos. En este trabajo, se estudio la asimilación de las SeNPs por parte de las células bacterianas empleando la técnica ICP-MS y la microscopia electrónica (TEM).

En primer lugar, se determinó el contenido de Se en los medio de cultivo y en el pellet bacteriano mediante ICPMS, previa mineralización ácida de la muestra en un horno de microondas. Los datos obtenidos evidenciaron unos valores bajos de incorporación del Se adicionado al medio de cultivo en el pellet (10-20%) para una exposición de 1 mg Se·L⁻¹. Al incrementarse la exposición a 10 mg·L⁻¹ de Se, la incorporación de Se aumentaba significativamente en el pellet (30-70% para SeNPs estabilizadas con hidroxietil celulasa y chitosan, respectivamente). Además, para los distintos tipos de SeNPs se observó una tendencia lineal en la acumulación/adsorción de Se en las células con el tamaño de NPs, es decir, al aumentar el tamaño de partícula se hace menor la cantidad de Se presente en las bacterias.

Una vez establecida la capacidad de acumulación de SeNPs por parte de las bacterias, se evaluó su biotransformación mediante el acoplamiento HPLC-ICPMS y el empleo de cromatografía de intercambio iónico, previa extracción de las especies por un procedimiento de hidrólisis enzimática. Una completa extracción y correcta identificación de las especies de Se es clave para determinar las funciones biológicas de este elemento, siendo los principales problemas asociados a la extracción de especies: la baja eficiencia de extracción de las especies, así como la posible interconversión y degradación de las mismas durante el proceso de tratamiento de la muestra. Generalmente, el selenio en muestras biológicas se encuentra unido a péptidos y proteínas, siendo necesario romper estas estructuras para obtener una extracción cuantitativa.

Con el fin de extraer cuantitativamente los seleno-compuestos presentes en los medios de cultivo y pellet bacteriano, se probaron tanto el empleo conjunto como por

separado de enzimas como la lisozima y la proteasa XIV en un medio tamponado TAE (pH 7.0; Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). La lisozima es una enzima que cataliza la hidrólisis entre los enlaces β -1,4 entre residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina de los peptidoglicanos con los residuos de N-acetil-D-glucosamina de las dextrinas, que se encuentran en las paredes celulares de bacterias, especialmente en bacterias Gram-positivas. La enzima proteasa tipo XIV, es una enzima no específica que lleva a cabo la hidrólisis de largas cadenas de proteínas en fragmentos más cortos. El tratamiento previo del pellet bacteriano con lisozima provoca la ruptura de la pared celular bacteriana, favoreciendo la acción posterior de la proteasa en la hidrólisis de las proteínas para la extracción de los seleno aminoácidos. Los mejores resultados se obtuvieron mediante la incubación con lisozima y, posterior sonicación en presencia de proteasa. En este caso, la extracción de especies de selenio fue cuantitativa y superior al 90%. En el caso de los medios de cultivo, sólo fue necesaria la sonicación en presencia de proteasa debido a que no hay bacterias presentes, en este caso la recuperación en la extracción de selenio es superior al 99%.

Los extractos obtenidos fueron analizados mediante HPCL-ICPMS. Los resultados pusieron de manifiesto la capacidad de *L. Bulgaricus* para biotransformar el Se acumulado en forma de Se inorgánico a otras especies orgánicas. Se observaron dos comportamientos distintos influidos por la dosis de Se suplementada a las bacterias. A bajas dosis de Se ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), la biotransformación a SeCys_2 como especie mayoritaria era evidente y fue independiente de la forma de selenio suplementada, tanto en forma de selenito como SeNPs, siendo el porcentaje de transformación mayor con las SeNPs, donde la biotransformación alcanzaba el 80%. En contraste, para elevadas concentración de selenio ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), la biotransformación producida era menor y distribuida entre la formación de SeCys_2 y SeMet, siendo la primera la especie orgánica mayoritaria. La mayor capacidad de transformación fue detectada para bacterias expuestas a CS-SeNPs. Es importante, indicar que las bacterias biotransforman con más rapidez las CS-SeNPs que el selenito. Es bien conocida la actividad antioxidante de la SeCys, debido a su presencia en la glutatión peroxidasa (GPx) demostrándose que dicha actividad antioxidante es mayor que la presentada por la acción de SeMet, e

inhibiendo en gran medida el daño oxidativo del ADN producido por la presencia de especies reactivas de oxígeno.

Con el fin de seguir profundizando sobre los mecanismos de internalización o unión SeNPs-bacteria, las células bacterianas fueron observadas por TEM. Las imágenes proporcionadas por la microscopía electrónica nos permitieron detectar SeNPs, tanto distribuidas en el interior de la bacteria como adheridas a la pared bacteriana.

Las SeNPs estabilizadas en quitosan son capaces de atravesar la pared bacteriana sin ocasionar daños a la misma. Una vez en el interior, las CS-SeNPs se biotransforman a compuestos orgánicos de selenio con propiedades antioxidantes, explicando la tolerancia de las bacterias a las CS-SeNPs. En lo que respecta a las SeNPs estabilizadas con hidroxietilcelulosa, su elevado tamaño hace que permanezcan mayoritariamente bioadsorbidas sobre la pared bacteriana y muy pocas penetran al interior, lo que disminuye los daños ocasionados. Por último, las SeNPs estabilizadas con el tensioactivo no iónico producen daños irreversibles en las paredes bacterianas. Este daño es producido fundamentalmente por el agente estabilizante.

En el caso de la exposición de *L. Bulgaricus* a elevadas concentraciones ($10 \text{ mg Se} \cdot \text{L}^{-1}$) de selenito, se observó la formación biológica de SeNPs, presentando dichas nanopartículas una morfología esférica y un tamaño de aproximadamente 100 nm. Es un hecho conocido que las bacterias son capaces de biotransformar selenito a selenio metálico (algunas veces en tamaño nanométrico) como mecanismo para aumentar su resistencia a la toxicidad provocada por elevadas concentraciones de selenio.

La conjunción de todos estos estudios, permitió por un lado demostrar el mayor efecto tóxico de Se(IV) frente a las SeNPs en *Lactobacillus Bulgaricus* y, por otro lado, demostrar la influencia del estabilizante en las NPs sobre el tamaño de partícula y su toxicidad. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las SeNPs estabilizadas enriquecidas en selenio basados en fermentaciones lácticas.

Como se ha demostrado, las bacterias lácticas son capaces de acumular de Se y transformar sus formas inorgánicas en especies orgánicas nutricionalmente más

seguras y bioactivas, sin comprometer la actividad metabólica y viabilidad de las propias bacterias. Como un paso necesario para la aplicación de estos resultados a la preparación de alimentos fermentados enriquecidos en selenio, se evaluó si esas **transformaciones son posibles durante el proceso de fabricación del yogurt**. Para ello, se preparó en el laboratorio yogurt enriquecido en selenio mediante la adición de fermentos lácticos que contienen *Lactobacillus*, a leche desnatada en presencia de 1 mg L⁻¹ de Selenio en forma de selenito. Transcurrido el período de fermentación durante 24 horas a 37 °C, el producto resultante se analizó con respecto a la distribución de proteínas que contienen selenio y selenoamino ácidos. La cantidad de selenio incorporado al yogurt se evaluó tanto en la fracción lipídica como en la fracción soluble de proteínas. La cuantificación del selenio en ambas fracciones por ICPMS, puso de manifiesto que el selenio aparece mayoritariamente en la fracción proteica .

La incorporación de selenio a las proteínas de yogurt se evaluó, mediante el acoplamiento de técnicas **SEC-ICPMS, SDS-PAGE-ICPMS y como novedad el acoplamiento AF⁴-ICPMS**. La técnica de fraccionamiento en flujo por aplicación de un campo asimétrico se aplicó para el pre-fraccionamiento de las proteínas antes de su separación por SDS-PAGE. La técnica de AF⁴ presenta la ventaja con respecto a SEC de una mejor resolución en la separación y posibilita la preconcentración de la muestra. Los resultados obtenidos por SDS-PAGE-ICPMS han mostrado que el selenio se encuentra asociado a dos fracciones de 20 y 70 KDa. La digestión trípica de ambas fracciones y posterior mapeo peptídico mediante nano LC-ESI/LTQMS permitieron identificar en las fracciones que contienen selenio, las siguientes proteínas: tiorredoxina, glutarredoxina, albúmina, β-lactoglobulina y lactoperoxidasas. Pero quizá, el hecho más destacable fue la detección de la proteína chaperona en las muestras de yogurt control (sin adición de selenito) pero no en la fracción proteica de yogures enriquecidos en selenio. Las chaperonas son un tipo de proteínas que se encuentran en las bacterias lácticas y que se expresan bajo condiciones de estrés (elevada temperatura, pH ácido...). Su no expresión en presencia de selenio podría indicar que este elemento alivia las condiciones de estrés que afecta a los *Lactobacillus*.

Análogamente a los estudios con *Lactobacillus*, se procedió a la evaluación de la capacidad de biotransformación de LAB en la elaboración de Yogurt suplementado con Se(IV). Uno de los principales problemas en la identificación de SeCys es la inestabilidad de este selenoamino ácido. Para preservar su integridad, se realizó un procedimiento de carbamidometilación en presencia de iodoacetamida y DTT, previo al proceso de hidrólisis enzimática con proteasa. Los extractos se analizaron mediante HPLC-ICPMS. Los resultados indicaron la presencia de selenocisteína como especie mayoritaria, lo que corrobora los resultados obtenidos con las bacterias y además ponen de manifiesto que las bacterias lácticas conservan su capacidad de transformación de selenio durante los procesos de fermentación.

Otra alternativa para paliar estados deficitarios de selenio es el desarrollo de alimentos de origen vegetal enriquecidos en selenio. Muchas plantas son capaces de acumular selenio, translocarlo a las partes aéreas y transformarlo a selenoamino ácidos.

La mayoría de los trabajos publicados utilizan selenito y seleniato como fuentes de selenio, pero existen muy pocos datos sobre acumulación y biotransformación de SeNPs en plantas. Con el objetivo de **profundizar sobre los mecanismos de acumulación y biotransformación de SeNPs en vegetales**, se cultivaron hidropónicamente rábanos (*Raphanus Sativus*) en presencia de selenio en forma de selenito (Na_2SeO_3) y como SeNPs estabilizadas con quitosan, en una concentración de $1 \text{ mgSe} \cdot \text{L}^{-1}$. Transcurrida la etapa de crecimiento, se recolectaron las partes comestibles (raíz) y se procedió a la determinación de selenio total y especies mediante ICPMS y HPLC-ICPMS, respectivamente. Los datos pusieron de manifiesto que la acumulación de selenio es un 25% superior en aquellas plantas cultivadas en presencia de Se(IV) con respecto a las cultivadas en presencia de SeNPs.

Para el estudio de la biotransformación de Se, se llevó a cabo una extracción previa de las especies mediante hidrólisis enzimática (empleando proteasa y 2 minutos de sonicación) y posterior determinación por LC-ICPMS utilizando dos mecanismos de separación cromatográfica (intercambio anionico y fase inversa). Los estudios de especiación de Se en la especie *Raphanus Sativus* demostraron que las dos formas

químicas, selenito y SeNPs, se metabolizan principalmente a MeSeCys y SeMet independientemente de la forma química en la que el selenio es administrado, poniendo de manifiesto la capacidad de biotransformación de SeNPs.

En general, en aquellas plantas expuestas a selenito, la mayoría del selenio es transformado a seleno aminoácidos: selenometionina, selenocisteína, γ -glutamyl selenometilselenocisteína, selenohomocisteína y selenometilselenometionina. Mientras que, se observa una baja transformación de selenio a otras formas orgánicas cuando la suplementación se realiza con Se(VI). En plantas no acumuladoras de selenio (como cereales) la especie mayoritaria de selenio es SeMet, mientras que en plantas acumuladoras de selenio (familia *Allium* y *Brassica*) los compuestos mayoritarios de selenio son SeMeSeCys y γ -glutamyl selenometilselenocisteína, amino ácidos que no se incorporan a las proteínas y por tanto no afectan al metabolismo de las plantas, facilitando la acumulación de mayores cantidades de selenio.

Con el fin de profundizar en el mecanismo de transformación de las SeNPs, las raíces de los rábanos tratados con SeNPs se visualizaron por TEM, previa extracción de las SeNPs con la misma disolución en la que se sintetizaron (ácido ascórbico). Las imágenes proporcionadas por TEM demostraban la presencia de NPs adsorbidas en la raíz y el análisis composicional mediante XEDS confirmó la naturaleza de las mismas como SeNPs. Parece ser que las SeNPs son adsorbidas en la superficie de la raíz, se disuelven por sustancias excretadas por la misma y son posteriormente metabolizadas a SeMeSeCys, siguiendo un mecanismo similar al que tiene lugar con el selenito. La técnica de AF⁴-UV-VIS-ICPMS se aplicó como técnica complementaria para caracterización de las SeNPs extraídas de la raíz. Para la separación de las mismas, se aplicaron las condiciones de separación previamente optimizadas. La caracterización por tamaños de las SeNPs en la raíz puso de manifiesto que se encontraban muy agregadas, en este caso los datos proporcionados por la técnica AF⁴ fueron diferentes a los proporcionados por TEM. Aunque existen muy pocas referencias sobre la transformación de NPs por plantas, los datos existentes corroboran nuestros resultados. En el caso de la aplicación de nanopartículas de CeO₂ en plantas de pepinos, las NPs eran adsorbidas en la superficie de las raíces y disueltas por parte de

sustancias excretadas desde las propias raíces, desde donde se producía la posterior absorción y acumulación.

La transformación de las NPs por los organismos vivos es un factor crucial a la hora de establecer su verdadera toxicidad. En los estudios realizados, tanto las bacterias lácticas como los rábanos son bastante tolerantes a la presencia de SeNPs. De todas ellas, las SeNPs modificadas con chitosan son las que mejores resultados proporcionaron en lo que respecta a acumulación, biotransformación a especies bioactivas de selenio (SeMeSeCys y Selenocisteína) y escaso efecto cito y fitotóxico. Estas características hacen de las SeNPs modificadas con chitosan como una fuente de selenio adecuada para la preparación de alimentos enriquecidos en selenio.

La otra aplicación de la presente Tesis es el desarrollo de envases alimentarios con capacidad oxidante mediante la incorporación de SeNPs.

La aplicación de SeNPs para su inclusión en envases alimentarios presenta un gran potencial para aumentar y asegurar la preservación del alimento en el interior del envase. Las restricciones impuestas por el Reglamento de la UE 10/2011 impide el uso de materiales que integren NPs y que éstas estén en contacto directo con el alimento, estando solo permitido el empleo de nitrato de titanio. Por ello, en este trabajo las SeNPs se aplicaron a los adhesivos empleados en envases flexibles multicapa.

Para el desarrollo de un nuevo envase con SeNPs, además de tener una síntesis controlada de SeNPs y asegurar su estabilidad, es necesario demostrar la eficiencia de la capacidad antioxidante de las NPs y evaluar la posible migración de las mismas desde el envase al producto en su interior, con el fin de asegurar la seguridad del consumidor. Por todo ello, se **evaluó la capacidad antioxidante SeNPs en distintos materiales y, la migración de las mismas una vez incorporadas a envases multilaminares.**

La determinación de la capacidad antioxidante, tanto de las disoluciones de SeNPs preparadas con distintos estabilizantes como en los envases multicapa una vez incorporadas las SeNPs, se llevó a cabo empleando dos mecanismos de reacción: capacidad de atrapar radicales de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y la capacidad de

absorción de radicales libres. El método DPPH se basa en la captura de radicales de DPPH por los compuestos antioxidantes, produciendo una disminución en la Absorbancia a 515nm. EL DPPH en disolución metanólica posee un intenso color morado y, al mezclarse con un átomo donador de hidrógenos la solución pierde dicho color. La aplicación de este método proporcionó resultados incoherentes con respecto a los obtenidos mediante el método de radicales libres. Una posible explicación es la interferencia óptica de las propias NPs en el paso de luz del espectrofotómetro.

La determinación de la capacidad antioxidante mediante la aplicación del método ORAC consiste en la generación de una atmósfera enriquecida en radicales libres que se hace pasar a través de las disoluciones de SeNPs o el material y, de una disolución de ácido salicílico mediante un gas inerte que actúa como portador. Una reacción entre los radicales no atrapados por el componente antioxidante y el ácido salicílico, conduce a la formación de los ácidos 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB) y 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB), entre otros compuestos. El principal compuesto resultante, 2,5-DHB se analiza mediante cromatografía líquida (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia, correlacionándose con las propiedades antioxidantes a través del porcentaje de hidroxilación de este compuesto. Un aumento en la capacidad antioxidante de SeNPs supondría una menor generación del compuesto 2,5-DHB y por consiguiente, un menor porcentaje de hidroxilación. Mediante la aplicación del método de radicales libres, se pudo observar como incluso los blancos de reacción poseían cierta capacidad antioxidante, asociada a compuestos con carácter antioxidante empleados en la síntesis de las SeNPs, como puede ser el ácido ascórbico empleado como agente reductor. Los resultados demostraron que las SeNPs con los distintos agentes estabilizantes poseían una elevada capacidad antioxidante con los mejores resultados cuando se emplea el tensioactivo no iónico (etoxilado 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol) cuya capacidad antioxidante supuso una disminución del grado de hidroxilación del 80%.

Una vez seleccionadas aquellas SeNPs que presentaban mayor capacidad antioxidante, se procedió a la fabricación de los envases multicapas aplicando las SeNPs a un adhesivo de carácter aniónico encargado de unir las dos capas de laminado compuestas por un PE y PET. En estos envases se estudió la influencia del

espesor de las capas de laminados en la capacidad antioxidante para espesores en la capa de PE de 35, 60 y 90 μ m. Por primera vez, se intentó la aplicación del método DPPH para la determinación de la capacidad antioxidante directamente en envases alimentarios, pero el gran tamaño de la molécula DPPH impide su difusión a través de la capa de PE, inhibiendo su interacción con las SeNPs incorporadas al adhesivo.

Por ello, la capacidad antioxidante del envase se realizó mediante el método de radicales libres. Los resultados confirmaban la tendencia obtenida en las disoluciones, a pesar de tener barreras, la capacidad antioxidante fue de un 60% en el envase alimentario; este porcentaje aumentaba, cuanto mayor era el espesor de la capa de PE. La buena capacidad antioxidante mostrada por los envases, pone de manifiesto la utilidad de las SeNPs para incrementar la vida útil de alimentos fácilmente oxidables como frutos secos. Además, la incorporación de SeNPs permite disminuir el número de capas necesarias que actúen como barrera.

Uno de los aspectos a controlar cuando se desarrolla un envase con nanopartículas incorporadas es la posible migración de las mismas al alimento con el consiguiente riesgo para el consumidor.

El proceso de migración se refiere a la liberación de una sustancia de un medio a otro. En líneas generales, este proceso sigue la primera ley de difusión de Fick, en la que la sustancia migra por un gradiente de concentración entre ambos medios. Cualquier NP que esté débilmente unida en el envase del alimento migrará desde el embalaje a la comida. Los factores que afectan a la migración son: temperatura y tiempo de exposición, gradiente de concentración, propiedades del material, posición migrante en el material y la interacción entre el migrante y material. Los estudios específicos de migración implican el análisis de un migrante particular del envase, con un enfoque que implique el peor escenario de migración.

El Reglamento de la UE Nº10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados para entrar en contacto con alimentos, establece un límite de migración desde materiales y objetos plásticos que no supere en total los 10 miligramos de constituyentes liberados por decímetro cuadrado de superficie de contacto (mg/dm²).

Los alimentos constituyen estructuras complejas, por lo que el análisis de las sustancias que migran a los alimentos puede plantear dificultades. Por ello, han de seleccionarse medios que simulen la transferencia de sustancias del material plástico a los alimentos. Estos medios deben representar las principales propiedades fisicoquímicas que muestran los alimentos. Al usar simulantes alimentarios, las condiciones normalizadas de duración y temperatura de ensayo deben reproducir, en la medida de lo posible, la migración que puede producirse desde el objeto al alimento.

De acuerdo a todo ello se realizaron los **ensayos de migración de Se procedentes de las NPs incorporadas en el envase multilaminar, utilizando** un alimento con un alto contenido en ácidos grasos y fácilmente oxidable como es la **avellana**.

Debido a que el contenido endógeno de selenio en el isótopo natural ^{78}Se es muy elevado en este tipo de alimentos, se realizó la síntesis de SeNPs a partir del isótopo enriquecido ^{77}Se y, así poder diferenciar entre el contenido de selenio endógeno y exógeno presente en el alimento. Los envases multilaminares con incorporación de $^{77}\text{SeNPs}$ en el adhesivo de acuerdo a la estructura PET-Adhesivo+SeNPs – PE, se rellenaron con avellana molida y se sometieron a las condiciones normalizadas del ensayo de acuerdo al reglamento 10/2011 para 10 días a 40°C. El contenido de selenio en el alimento se analizó mediante ICPMS, previa mineralización ácida de la muestra. Los resultados sobre la relación $^{77}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ en la avellana después de la digestión ácida, fueron similares y no se encontraron diferencias significativas entre los controles (muestras contenidas en los envases sin SeNPs) ó envases con $^{77}\text{SeNPs}$ incorporadas. Así mismo, se evaluó el efecto del espesor de la capa de PE sobre la posible migración; corroborándose, que no existían riesgos de migración de SeNPs desde los envases bajo ningún tipo de espesor de la capa de PE.

Los trabajos desarrollados y expuestos en esta última parte de la presente tesis doctoral, permitieron evaluar el comportamiento antioxidante de envases laminares con incorporación de SeNPs como material activo y, la elección de aquellas NPs con el estabilizante que ofrece mejores características antioxidantes y mayor compatibilidad

con el adhesivo a emplear en los envases. Así mismo, se evaluaron los posibles riesgos provocados por la migración de selenio desde envases PET- Adhesivo+SeNPs - PE a alimentos mediante el empleo del Reglamento actual de la Unión Europea Nº 10/2011, quedando demostrada la baja tendencia del selenio para migrar a los alimentos en las condiciones normalizadas (10 días a 40°C), que garantiza la seguridad del alimento en condiciones previstas de almacenamiento.

**Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.
Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes**

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes de esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

1. La **síntesis de SeNPs** puede controlarse mediante la optimización de parámetros tales como: la concentración y composición química del **agente estabilizante, la relación ácido ascórbico/ Na_2SeO_3 y el pH**. El empleo de polisacáridos (chitosan) como agente estabilizante queda condicionado por su pI y el pH de la suspensión de NPs, pudiendo dar lugar a problemas de floculación y agregación. El empleo de surfactantes no-iónicos en la síntesis de SeNPs da lugar a NPs estables y de geometría esférica. Además, su empleo para la preparación de envases alimentarios mediante su incorporación al adhesivo industrial (la mayoría de carácter aniónico) no presenta limitaciones en lo referente al pH.

2. El uso de la **técnica de AF^4 acoplado a DAD-ICPMS** ha demostrado ser apropiada para **separar, detectar y caracterizar SeNPs**. Sin embargo, presenta limitaciones, proporcionando buenos resultados, en relación a la caracterización de tamaños, siempre que se trate de NPs esféricas y no agregadas.

3. El empleo de la técnica AF^4 -DAD-ICPMS como fraccionamiento previo a separación por SDS-PAGE ha permitido detectar en la fracción de proteínas solubles de yogures enriquecidos en selenio dos bandas **que contienen selenio en el rango de 10-70kDa**. Su posterior digestión triptica y análisis mediante nano-HPLC ESI/LTQMS revelaron la presencia de proteínas con funciones antioxidantes como Tiorredoxina y Glutarredoxina. Hay que destacar, la **detección de Chaperonas en controles y su ausencia en el Yogurt enriquecido con Se**, lo cual podría indicar que el **selenio juega un papel clave en la expresión** de dichas proteínas y por consiguiente, en la disminución de estrés que afecta a los *Lactobacillus* en la fermentación láctica.

4. La **evaluación de los efectos** producidos por **distintas especies de selenio** (selenito y SeNPs con diferentes agentes estabilizantes) sobre bacterias responsables de procesos de fermentación láctica como *Lactobacillus Bulgaricus*, puso de manifiesto que a bajos niveles de exposición de Se ($1\mu\text{g Se}\cdot\text{mL}^{-1}$) no afectaba a la viabilidad ni al crecimiento bacteriano. Además, el análisis del contenido de Se total y especies de Se en las bacterias expuestas ha permitido determinar una **mayor acumulación de Se** en las mismas **tras su exposición a SeNPs modificadas con chitosan**, además de una **elevada biotransformación a especies orgánicas**, principalmente SeCys_2 con propiedades antioxidantes. Tras la exposición a elevadas concentraciones de Se ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), las diferentes composiciones químicas de los agentes estabilizantes de SeNPs ofrecen efectos citotóxicos distintos en *L. Bulgaricus*, evidenciando la influencia de la naturaleza del recubrimiento sobre la toxicidad.

5. La **suplementación de *Raphanus Sativus* con SeNPs estabilizadas con Chitosan** demostró que éstas se transformaban mayoritariamente (95%) a **SeMetSeCys y SeMet**, principalmente. A su vez, el empleo de las técnicas de TEM y $\text{AF}^4\text{-DAD-ICPMS}$ permitió el análisis y caracterización de NPs adheridas en las raíces de las plantas, sugiriendo que la las SeNPs se adhieren a la raíz donde se disuelven y son posteriormente acumuladas por parte de la planta siguiendo un mecanismo similar al selenito.

6. La **capacidad antioxidante de SeNPs en diferentes materiales multicapas se ha evaluado aplicado dos métodos: DPPH y radicales libres**. Los mejores resultados en relación a la capacidad antioxidante se obtuvieron empleando el surfactante no iónico como agente estabilizante. Además, se ha comprobado las **limitaciones de la aplicación del método de DPPH para la determinación de la capacidad antioxidante de SeNPs directamente en suspensión** y en los propios envases.

7. De acuerdo al Reglamento de la UE 10/2011 se han evaluado los posibles riesgos provocados por la **migración de SeNPs desde el envase a alimentos** como es la avellana molida. Los resultados mostraron que las

cantidades extraídas de selenio se encontraban por debajo de los límites máximos permitidos ($10\mu\text{g Se}\cdot\text{K}^{-1}$). Esto demuestra la baja tendencia de las SeNPs para migrar a los alimentos desde envases multicapa, garantizando la seguridad del alimento.

Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.

Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes

TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS

TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Las selenoproteínas están implicadas en una gran variedad de procesos biológicos, sin embargo, muchas de sus funciones se desconocen, convirtiéndose su estudio en un tema de especial interés en distintas áreas científicas (bioquímica, medicina, epidemiología, química...).

En éste trabajo (**“Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoproteins studies”**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400 (2011) 1717) se describen las selenoproteínas mejor caracterizadas y sus funciones, así como se exponen casos clínicos y de suplementación de selenio. Además, en la segunda parte de este trabajo se recogen las ventajas y limitaciones de las técnicas analíticas más relevantes empleadas en el estudio de las selenoproteínas y proteínas que contienen selenio como: la cromatografía multidimensional acoplada a la espectrometría de masas (ICP-MS), la espectrometría de masas en tándem con ionización con electrospray (ESIMS/MS), la espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) y la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico con ablación láser acoplada a espectrometría de masas (SDS-PAGE-LA-ICPMS).

Además de suplementos nutricionales para alimentación humana, también existe interés en el desarrollo de piensos enriquecidos ya que se han registrado y demostrado enfermedades en el ganado, asociados a estados carenciales de selenio. Puesto que la ingesta de Se, proviene de la dieta y ante la escasez del mismo en el suelo en países como Finlandia; desde 1984 se está procediendo a la adición de Se en los fertilizantes, consiguiendo una disminución en la enfermedad del músculo blanco en el ganado. A pesar de ello, el problema de la baja biodisponibilidad en el suelo sigue latente y, los niveles de Se en el forraje para los animales no es suficiente para cubrir los niveles básicos del mismo.

El ensilado es un proceso de conservación del forraje basado en una fermentación láctica del pasto que produce ácido láctico y una disminución del pH, permitiendo retener las cualidades nutritivas del pasto original mucho mejor que el henificado. Aunque la UE permite el uso como aditivos de Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 y algunas formas orgánicas de Se; la adición directa de las formas orgánicas (pese a ser más seguras y eficaces que las sales inorgánicas) está restringida en procesos de ensilado con base ácida por posibles riesgos a la salud debido a la formación de ácidos. En el Segundo trabajo presentado dentro de este capítulo (**“Selenium Supplementation by addition of sodium selenate with silage additive”**. Agricultural and Food Science, 23 (2014) 81) se ha evaluado el efecto del seleniato sódico como aditivo para ensilados y, la posible biotransformación durante el proceso de fermentación láctica del mismo. Como se deduce, la adición de Na_2SeO_4 durante el ensilaje facilita la obtención de un pienso que facilita la suplementación de selenio en la dieta de los animales, sin costes adicionales.

VII.1 Selenoproteínas: factor clave de la esencialidad del selenio. Técnicas Analíticas Avanzadas para el estudio de Selenoproteínas.

“Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality.

State of the art analytical techniques for selenoprotein studies”

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400 (2012) 1717

Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies

Isabel Lopez Heras · Maria Palomo · Yolanda Madrid

Received: 29 December 2010 / Revised: 10 March 2011 / Accepted: 14 March 2011 / Published online: 1 April 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Selenium is an essential element for human health. The benefits of selenium are many including protection against cancer, heart diseases and other cardiovascular and muscle disorders. Selenium is also helpful in controlling gastrointestinal disorders, enhancing immunity of the human body and reducing age-related diseases. The health-promoting properties of Se are due to vital functions of selenoproteins in which selenium is present as selenocysteine, the 21st amino acid. To date, dozens of selenoprotein families have been described though many have roles that have not been fully elucidated. Selenoproteins research has attracted tremendous interest from different scientific areas. Analytical chemists have not remained indifferent to the attractive features of these unique proteins. Different analytical techniques, such as multidimensional chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), electrospray (tandem) mass spectrometry (ESI-MS/MS), matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight (MALDI-TOF) and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis–laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (SDS-PAGE-LA-ICPMS), have been applied to the determination of selenoproteins and selenium-containing proteins. This review describes the best-characterized selenoproteins to date in addition to the major contributions of analytical chemistry to the field of selenoproteins. The article also highlights the challenges of combining elemental and molecular mass spectrometry for the determination of selenoproteins and selenium-containing proteins.

Keywords Mass spectrometry / ICP-MS · Genomics / Proteomics · Bioanalytical methods · Speciation

Introduction

Selenium (Se) is an essential element for human health. Historically, it was considered to be a toxic agent in mammals. However, Schwarz and Foltz [1] reported in 1958 that selenium prevented liver necrosis in rats under vitamin E deficiency. This finding together with a report [2] that highlights the importance of selenium when *Escherichia coli* is grown anaerobically in the presence of glucose supports the consideration of selenium as an essential nutrient for mammals and for certain bacteria. Later it was revealed that selenium deficiency was the cause of several disorders in animals, such as white muscle disease, in addition to contributing to Keshan disease in humans [3]. Currently, the essentiality of selenium is beyond doubt and its effect on the appearance of several diseases has been reviewed extensively in the literature [4–8]. Selenium deficiency in addition to mutations or polymorphisms in selenoprotein genes and synthesis cofactors are all factors involved in a wide variety of diseases, such as muscle and cardiovascular disorders, immune dysfunction, cancer, and neurological and endocrine function disorders.

On the basis of the aforementioned evidence, it is no wonder that selenium biochemistry has developed rapidly in the last 30 years. Selenoproteins and selenium metabolomics studies have also attracted the interest of the analytical chemistry community. Different analytical techniques, such as multidimensional chromatography–ICPMS (inductively coupled plasma mass spectrometry), electrospray (tandem) mass spectrometry (ESI-MS, ES-MS/MS), matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight

I. L. Heras · M. Palomo · Y. Madrid (✉)
Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Complutense de Madrid,
Avda. Complutense s/n,
28040 Madrid, Spain
e-mail: ymadrid@quim.ucm.es

VII.2. Suplementación de Selenio por Adición de Seleniato Sódico a los aditivos para procesos de ensilado

“Selenium Supplementation by addition of sodium selenate with silage additive”

Agricultural and Food Science, 23 (2014) 81

AGRICULTURAL AND FOOD SCIENCE

A. Seppälä et al. (2014) 23: 81–88

Selenium supplementation by addition of sodium selenate with silage additive

Arja Seppälä¹, Yolanda Madrid Albarrán², Harri Miettinen³, Maria Palomo Siguero², Elina Juutinen^{1,4}
and Marketta Rinne¹

¹MTT Agrifood Research Finland, Animal Production Research, 31600 Jokioinen, Finland

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Madrid Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid, Spain

³Kemira Oyj, P.O. Box 330, 00101 Helsinki, Finland, current: Nöykkiölaaksontie 27C6, 02330 Espoo, Finland

⁴Current address: Atria Ltd, Finland

e-mail: arja.seppala@mtt.fi

An ensiling experiment was conducted to assess the possibility for increasing the selenium content in grass silage by using a selenium-enriched silage additive, and to determine possible changes in the form of selenium during ensiling. Prewilted and precision-chopped silage was prepared from the second cut of timothy – meadow fescue sward in southern Finland. The additive treatments (6 g kg⁻¹) were: control without additive, water containing 50 mg sodium selenate kg⁻¹, and formic acid-based additive containing 10, 50 or 500 mg sodium selenate kg⁻¹. The selenium content of the control silage was low (0.069 mg kg⁻¹ dry matter) whereas the selenium content of the other silages was in line with the dose level of selenium delivered in the additive. The added selenate was detected only as selenate in the silages. Addition of sodium selenate to silage additive provided a controlled way to add selenium to the diet of forage-fed animals.

Key words: ensiling, feeding, fermentation, ruminant, selenium

Introduction

Selenium is a micromineral of fundamental importance to human and animal health, although toxic in excess. It is an essential component of several major metabolic pathways, including thyroid hormone metabolism, antioxidant defence systems and immune function (Brown and Arthur 2001). Low selenium bioavailability in soils in many parts of the world (e.g., parts of Europe and China) is reflected in naturally low selenium content of feedstuffs and in food produced from those areas (Johnson et al. 2010). Selenium-deficiency symptoms have been detected in animals (e.g. white muscle disease) and humans (Keshan disease, endemic cardiomyopathy, heart disease) in areas low in selenium bioavailability (Johnson et al. 2010). The European population has generally low selenium status (Johnson et al. 2010). Potential benefits in terms of improved immune response and reduced cancer incidence and thyroid autoimmune disease risk have been detected and related to increased selenium intake by humans (Rayman 2008). This has encouraged the bringing to market of selenium-enriched food products and selenium supplements in order to alleviate the deficiency (Rayman 2008). Supplement products, however, are not a straightforward solution due to the risks associated with potential selenium overdose from multiple sources (Rayman 2008). Thus, safe means for adding selenium to basic foodstuffs are still needed to ensure the health of both humans and domestic animals.

Although the most severe symptoms of selenium deficiency in cattle (white muscle disease) are quite rare nowadays (Eurola et al. 2011), the less-precise symptoms such as muscular weakness of the newborn, reduced weight gain, diarrhea or decreased fertility (Koller and Exon 1986) may be linked to selenium deficiency. The low selenium content of cows' milk (less than 0.15 mg kg⁻¹ dry matter (DM)) produced on organic farms compared to non-organic milk (average 0.23 mg kg⁻¹ DM) reflects the low level of selenium in diets on those farms (Eurola et al. 2011). Keeping in mind the high costs of each case of clinical mastitis (270–670 € per case for dairy cows; Heikkilä et al. 2010), the benefits to udder health from ensuring a sufficient selenium supply (Smith et al. 1985, ref. Smith et al. 1997, Jukola et al. 1996, Giadinis et al. 2011) should be taken into account when planning mineral supplementation of dairy cows as well as lactating ewes.

Manuscript received March 2014

Síntesis, Caracterización y Biotransformación de Nanopartículas de Selenio.
Aplicación al desarrollo de envases antioxidantes

VIII. GLOSARIO DE TÉRMINOS

VIII. GLOSARIO DE TÉRMINOS

2,3-DHB: Ácido 2,3-dihidroxibenzoico

2,5-DHB: Ácido 2,5-dihidroxibenzoico

AE: Intercambio aniónico

AF⁴: Fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico

AFM: Microscopía de fuerza iónica

BSA: Albúmina de suero bovino

CAOX: Capacidad Antioxidante

CE: Electroforesis capilar

CS: Chitosan

DAD: Detector de diodo array

DIOs: Yodotironina deyodinasas

DLS: Dispersión de luz dinámica

DMDSe: Dimetildiseleniuro

DMSe: Dimetilseleniuro

DPPH: 2,2-Difenilpicrilhidrazilo

EPA: Agencia de Protección Ambiental

ESI-MS: Espectrometría de masas de ionización por electrospray

FC: Citometría de flujo

FDA: Administración de comida y medicamentos

GC: Cromatografía de gases

GPx: Glutación peroxidasa

HG-AAS: Espectroscopía de absorción atómica mediante generación de hidruros

HG-AFS: Espectroscopía de fluorescencia atómica mediante generación de hidruros

H₂Se: seleniuro de hidrógeno

HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

ICP-OES: Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo

IP-ICPMS: Dilución isotópica- Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

ID: Yodotiroina deyodinasas

IDA: Análisis por dilución isotópica

IP: Yoduro de propidio

LAB: Bacteria ácido láctica

MALDI-TOF: espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz

MALS: láser multi-ángulo de dispersión de luz

MS: Espectrometría de masas

Na₂SeO₃: Selenito sódico

Na₂SeO₄: Seleniato sódico

ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

PE: Polietileno

PEG: Polietilenglicol

PET: Tereftalato de polietileno

PS: Fosfatidilserina

PSL: Látex poliestireno

QDs: Quantum Dots

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RP: Fase inversa

SeAlb: Seleno albúmina

SEC: Cromatografía de exclusión molecular

SeCys: Selenocisteína

SeCys₂: Selenocistina

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SeMeSeCys: Selenometilselenocisteína

SeMet: Selenometionina

SeO₂: Dióxido de selenio

SeNPs: Nanopartículas de selenio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

sp-ICPMS: single particle-Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TiN: Nitruro de Titanio

TMSe⁺: Trimetilseleniuro

TRx: Tioredoxina reductasa

UE: Unión Europea

XEDS: Espectroscopia de rayos X

